

206  
29



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EL PAPEL DE LOS GANGLIOSIDOS EN EL SISTEMA  
DE TRANSPORTE NEURONAL DE ACIDO  
GAMMA - AMINOBUTIRICO

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A:  
FRANCISCO ROBERTO VERGARA SILVA



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
Director:  
DR. RICARDO TAPIA IBARGUENGOYTIA

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
MEXICO, D.F. 1966

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e


Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"El papel de los gangliósidos en el sistema de transporte  
neuronal de ácido gamma-aminobutírico"  
realizado por Francisco Roberto Vergara Silva  
con número de cuenta 9052217-0 , pasante de la carrera de Biología.  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

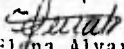
Atentamente

Director de Tesis


Propietario

  
Dr. Ricardo Tapia Ibarquengoytia


Propietario

  
Dra. Elyna Alvarez-Buylla Rocas


Propietario

  
M. en IBB. Jorge Alberto Pérez León

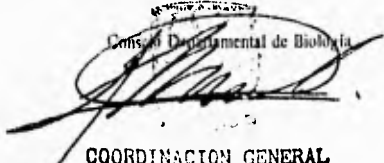
Suplente

  
Biol. Asturo Becerra Bracho

Suplente

  
Biol. Juan B. Bingham

Consejo Departamental de Biología

  
COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGÍA

## INTRODUCCIÓN

### Generalidades

La transmisión sináptica en los sistemas nerviosos de una gran cantidad de especies animales, especialmente vertebrados, es un proceso que incluye, entre otros elementos, la emisión de señales anterógradas que conocemos como **neurotransmisores**, moléculas de muy variable composición química. Se trata fundamentalmente de aminoácidos, péptidos pequeños y aminas biogénicas que son responsables de eventos rápidos de comunicación química, en forma de acciones sinápticas excitatorias e inhibitorias (Kandel et al., 1991; Jessell y Kandel, 1993). La comunicación sináptica está controlada por una serie de proteínas con características propias que las agrupan en familias, y que establecen un sinnúmero de interacciones con las moléculas neurotransmisoras. Todas ellas son proteínas integrales de membrana que se localizan principalmente en el sistema nervioso, aunque a veces se expresan en otros tejidos. A grandes rasgos, se trata de los siguientes tipos de proteínas (Figura 1):

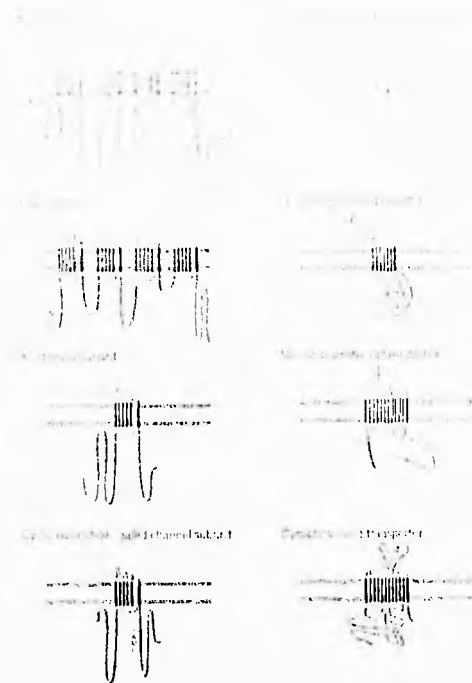
- a) Canales de  $\text{Na}^+$
- b) Canales de  $\text{Ca}^{2+}$
- c) Canales de  $\text{K}^+$
- d) Canales asociados a nucleótidos cíclicos
- e) Receptores/canales asociados a neurotransmisores
- f) Receptores asociados a proteínas G
- g) Transportadores o acarreadores membranales de vesículas sinápticas
- h) **Transportadores de membrana plasmática para neurotransmisores**

Desde la década de los setenta, se estableció que el último grupo de proteínas mencionado es el responsable de una rápida y eficiente finalización de dicha comunicación, y que se trata de transportadores de alta afinidad, dependientes de  $\text{Na}^+$  y otros iones, que se encuentran tanto en la membrana plasmática de las terminales nerviosas presinápticas como en las membranas de células gliales y que recapturan a sus neurotransmisores correspondientes una vez que éstos han dejado de actuar sobre su receptor (Iversen, 1971; Logan y Snyder, 1971; Erecínska, 1987).

En años recientes, se ha avanzado mucho en el conocimiento de las características estructurales de estas proteínas gracias a la aplicación de detallados procedimientos bioquímicos de purificación y a las técnicas de la biología molecular. De manera especial, sobresale el descubrimiento de una realmente sorprendente variedad de genes que codifican para cotransportadores de  $\text{Na}^+$ , casi todos de expresión exclusiva en el sistema nervioso (Tablas I y II). Esta familia multigénica incluye a las secuencias a partir de las cuales se transcriben, traducen y modifican postraduccionalmente **los transportadores o acarreadores de alta afinidad para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)**.

El GABA es un importante aminoácido neuroactivo, considerado como el neurotransmisor inhibitorio más abundante en el sistema nervioso. Su principal vía de síntesis consiste en la descarboxilación del ácido glutámico, catalizada por la enzima glutamato descarboxilasa (GAD), mientras que su degradación se hace fundamentalmente a través de una transaminasa cuya reacción produce nuevamente glutamato más semialdehído succínico (Figura 2; Tapia, 1983). Para que ésta última reacción -que ocurre en el interior de la terminal presináptica y en ocasiones en células gliales- se lleve a cabo, es necesaria la recaptura del transmisor, desde el espacio intersináptico, a través de los transportadores específicos que

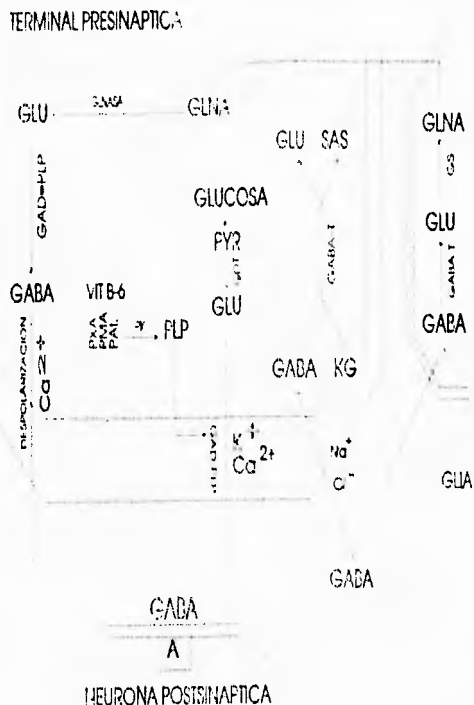
hemos mencionado. La regulación de la actividad de estos transportadores en una preparación subcelular enriquecida en terminales sinápticas aisladas -los sinaptosomas- es el tema general del presente trabajo.



**Figura 1.** La estructura de las proteínas que controlan la función sináptica. El tercer esquema (de arriba hacia abajo) de la segunda columna corresponde a los transportadores de membrana neuronal sináptica. Tomado de Jessell y Kandel (1993).

### Biología molecular de los transportadores de neurotransmisores. La (super)familia de genes GAT

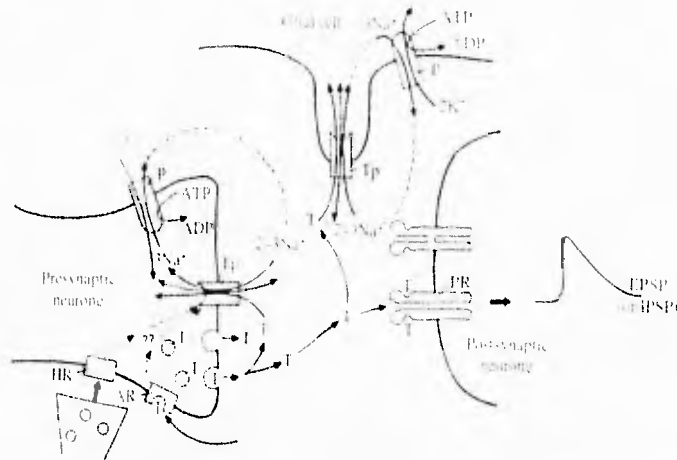
La altísima variabilidad molecular de los diversos miembros de la familia de transportadores neuronales dependientes de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  implica que en las neuronas y células gliales se lleva a cabo una delicada regulación de la recaptura de neurotransmisores, lo cual subraya la importancia de este mecanismo durante la transmisión sináptica (Schloss et al., 1994; **Figura 3**). El cotransportador cerebral de GABA dependiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  fue el segundo cotransportador de  $\text{Na}^+$  en clonarse proveniente de mamíferos (Guastella et al., 1990) y es el que le dio nombre a esta familia de genes y proteínas. La estrategia empleada para su clonación consistió en usar un oligonucleótido basado en la secuencia de un fragmento de la proteína



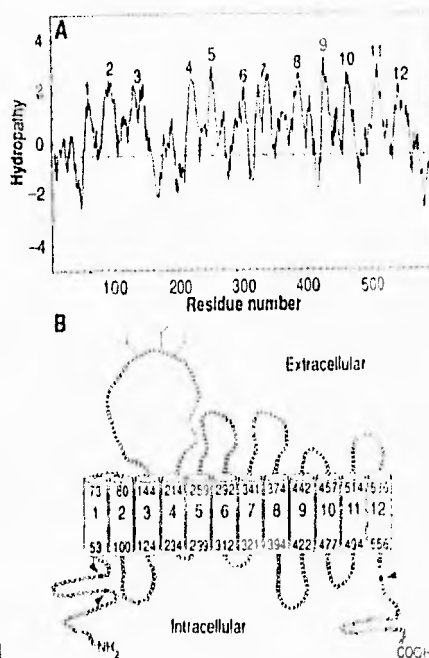
**Figura 2.** Compartimentalización del metabolismo del GABA en el sistema nervioso central de los mamíferos. Basado en Tapia (1983).

purificada para después seleccionar el mRNA que correspondiera al transportador en una biblioteca de cDNAs mediante técnicas de hibridización. De las clonas selectas, una resultó positiva en el ensayo de expresión en ovocitos de *X. laevis*; ésta fue la clona caracterizada en ese trabajo y se le llamó GAT-1. La secuencia obtenida de la clona estaba compuesta de 599 residuos, y el análisis de hidropatía indicaba la presencia de 11 a 13 dominios transmembranales. En ese momento, el perfil de estructura secundaria hacía parecer que la proteína era muy distinta de otros transportadores, y no se le encontró similitud de secuencia con ningún otro péptido (Figura 4). Es importante decir, también, que hasta este momento aún se pensaba que el sistema de recaptura de alta afinidad de GABA dependía de una proteína codificada por un solo gen. Como se detallará más adelante, en la actualidad se conocen varios genes distintos que codifican para diferentes acarreadores de GABA. Muy probablemente, esta multiplicidad génica no sea exclusiva de las proteínas de transporte de este aminoácido neurotransmisor.

En el año de 1992, el esfuerzo de varios grupos de investigación distribuidos en diferentes países había dado como resultado la clonación, secuenciación y expresión de siete cotransportadores relacionados, que representaban ya a las principales subfamilias de cotransportadores de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>; la única clona que no provenía de cerebro era la del acarreador renal de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/betaina (Wright et al., 1992; Tabla I). Esto se logró mediante el uso de vectores de expresión y PCR, usando oligonucleótidos derivados del transportador de GABA, así como ovocitos de *X. laevis* y células en cultivo para los ensayos de expresión. En 1993 y 1994, el número de clonas diferentes de transportadores creció, pero ninguna nueva subfamilia de transportadores neuronales fue establecida. Durante el año pasado, la situación fue la misma.



**Figura 3.** El papel de los transportadores de membrana plasmática para neurotransmisores. El neurotransmisor (T), almacenado en las vesículas sinápticas, es liberado mediante la fusión de las vesículas con la membrana presináptica. Después de su difusión a través del espacio intersináptico, se asocia con res postsinápticos (PR), ocasionando la apertura de canales que con frecuencia toman parte del mismo receptor. La apertura de los canales puede llevar a la producción de potenciales postsinápticos excitatorios ó inhibitorios (EPSPs ó IPSPs). El transmisor es removido del espacio por recaptura mediada por transportadores electrogénicos acoplados a sodio (Tp), que también translocan otros iones (\*). En el caso de los transportadores pertenecientes a la superfamilia GAT, \* representa cloruro, que se mueve en la misma dirección que el sodio y el neurotransmisor. En el caso de los transportadores de ácido glutámico, \* representa potasio, que se mueve en dirección opuesta al sodio y al glutamato. La principal fuerza motriz para este proceso es el gradiente electroquímico de iones de sodio, que es mantenido por la ATPasa de sodio/potasio (P).



**Figura 4.** Perfil de hidropatía y estructura secundaria hipotética de la proteína GAT-1 deducida por Guastella et al. (1990). **A:** Análisis de Kyte-Doolittle con una ventana de nueve aminoácidos. Las regiones transmembranales putativas están numeradas. **B:** Diagrama esquemático de la posible orientación membranal de GAT-1. Los aminoácidos individuales se dibujan como círculos, y los dominios transmembranales como cilindros. Las puntas de flecha indican sitios putativos de fosforilación por PKC, mientras que las líneas ramificadas representan tres de los cuatro sitios putativos de glicosilación de la proteína.



La **Tabla II** muestra el recuento actualizado, tomando como base el artículo de Nelson y Lill (1994) y una búsqueda hecha en Medline de las bases de datos más recientes (hasta finales de 1995). En esta recopilación se tienen en cuenta también dos extrañas secuencias, obtenidas a partir de bibliotecas de cDNA de cerebro de rata, que son las más divergentes de toda la superfamilia y que no tienen un sustrato claramente definido (Uhl et al., 1992; Liu et al., 1993; El Mestikawy et al., 1994). De cualquier manera, la diferencia entre las Tablas I y II es una muestra contundente de la explosión de información en el área.

En estas Tablas no se hace mención de los transportadores de ácido glutámico, debido a que las características estructurales y funcionales de estas moléculas son diferentes de las de los miembros de la superfamilia GAT. La importancia del glutamato como neurotransmisor en el sistema nervioso (Kandel et al., 1991), así como la complejidad de los sistemas de recaptura del mismo (Kanai et al., 1993), merecen un trato detallado e individual que, evidentemente, está fuera del alcance del presente trabajo.

**Tabla I.** La familia de cotransportadores de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>: comparaciones de la secuencia de aminoácidos de proteínas homólogas al cotransportador de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>/GABA de cerebro de rata (tomado de Wright et al. 1992).

Transportador	Nombre	Fuente	Identidad (%)	Similitud (%)	# de aa codificados	Referencia
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> /GABA	GAT1	cerebro de rata	100	100	599	Guastella et al. (1990) Nelson et al. (1990)
		cerebro de humano	97	100	599	
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> /glicina	GLYT1	cerebro de rata	45	68	638	Smith et al. (1992)
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> /betaina	BGT1	riñón de perro	52	73	614	Yamauchi et al. (1992)
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> /dopamina	DAT1	cerebro de rata	45	67	619	Shimada et al. (1991), Kilty et al. (1991)
Na <sup>+</sup> /Cl <sup>-</sup> /serotonina	SERT1	cerebro de rata	43	67	607	Blakely et al. (1991)
Na <sup>+</sup> /noradrenalina	NET1	cerebro de humano	46	68	617	Pacholczyk et al. (1991)
Na <sup>+</sup> /prolina	PROT1	cerebro de rata	44	65	637	Frémeau et al. (1992)

La superfamilia del transportador del GABA está compuesta por proteínas con 599-799 residuos. Las constantes de afinidad encontradas por sus sustratos caen dentro la gama de 0.3-100 μM. De acuerdo con Kanner (1994), la familia puede dividirse en cuatro subgrupos: (a) transportadores de aminas biogénicas (noradrenalina, dopamina y serotonina); (b) transportadores de GABA, taurina y creatina; (c) transportadores de prolina y glicina; y (d) transportadores "huérfanos". En mi opinión, los transportadores encontrados en bacterias y hongos (*E. coli* y *S. cerevisiae*, Tabla II) podrían constituir un quinto subgrupo.

Todas estas proteínas comparten algunos rasgos comunes de estructura secundaria que las asemejan y las diferencian de los miembros de otras familias de transportadores (Figura 5). Cada transportador de la familia GAT está compuesto por 12 dominios transmembranales putativos, todos ellos α-hélices. La falta de un péptido señal sugiere que tanto el extremo amino- como el carboxilo-terminal miran hacia el citoplasma. Estas regiones contienen sitios putativos de fosforilación, que pueden estar involucrados en la regulación de la recaptura de los

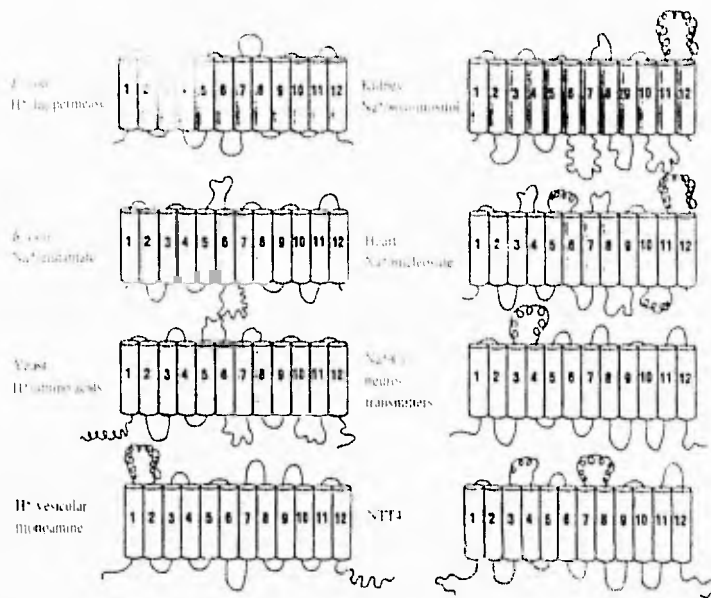
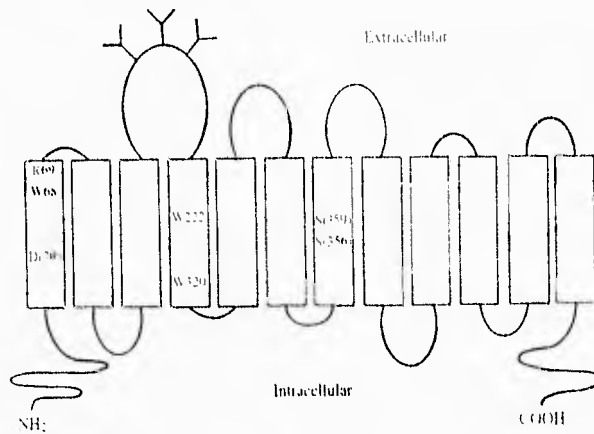


Figura 5. Organización propuesta de las hélices transmembranales y las asas periféricas de los transportadores con doce dominios transmembranales. Tomado de Nelson y Lill (1994).

Figura 6. Representación esquemática del transportador de GABA (GAT-1) y localización de los aminoácidos críticos. Los segmentos transmembranales putativos se dibujan como rectángulos. Los sitios potenciales de glicosilación se indican con líneas ramificadas. La identidad y posición de los residuos críticos de GAT-1 se indican usando el código de una letra. También se indican los residuos importantes para el funcionamiento óptimos del transportador de dopamina (DAT-1). En este caso las posiciones se indican entre paréntesis, usando la numeración de DAT. Tomado de Kanner (1994).



sustratos. La segunda asa intracelular, localizada entre las  $\alpha$ -hélices 3 y 4, es la más larga y contiene de 2 a 4 sitios de glicosilación. La alineación de las secuencias de aminoácidos deducidas para 13 diferentes miembros de esta superfamilia, cuyos sustratos se conocen (subgrupos a-c) ha revelado que algunos segmentos de estas proteínas tienen un grado de similitud mayor que otros. Las regiones más conservadas (>50% de similitud) son la hélice 1, junto con el asa extracelular que la conecta con la hélice 2, y la hélice 5, junto con la pequeña asa intracelular que la conecta con la hélice 4 y el asa un poco más larga que la conecta con la hélice 6 (Jursky et al., 1994; Kanner, 1994; Nelson y Lill, 1994). Es posible que estos dominios participen en la estabilización de una estructura terciaria esencial para la función de todos los acarreadores. Otra posibilidad es que tengan que ver con la translocación de los iones de sodio; esta suposición es de índole general, porque únicamente se basa en suponer que aquellas regiones conservadas son responsables de las funciones que todos los transportadores tienen. Como veremos más adelante, la idea original de que los dominios transmembranales conservados son las únicas regiones de importancia en la función de estas proteínas no es correcta.

La región final que comienza a partir de la hélice 9 es bastante más variable que el segmento que contiene a las primeras 8 hélices; por esta razón se piensa que el extremo carboxilo-terminal está involucrado en la translocación de los diferentes sustratos. De hecho, los segmentos menos conservados son los extremos amino- y carboxilo-terminal (Majeeh y Kanner, 1993).

**Tabla II.** Diversidad de los cotransportadores de Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> caracterizados hasta 1995 (Actualizado de Nelson y Lill, 1994).

Nombre	Sinónimo	Sustrato	Referencias
Htundoptra	DOPAT-H	Dopamina	Vandenberg et al. (1992)
Randoper	DOPAT-R	Dopamina	Shimada et al. (1991)
Bovdopair	DOPAT-B	Dopamina	Uslin et al. (1991)
Humnortr	NORAT-H	Noradrenalina	Pacholczyk et al. (1991)
Nit1	NORAT-B	Noradrenalina	Pacholczyk et al. (1991)
Rsertran	SEROT-R	Serotonina	Blakely et al. (1991)
Glyt2	GLYT2-R	Glicina	Liu et al. (1993a)
Glyt1	GLYT1-M	Glicina	Liu et al. (1992c)
Nit4r	NIT4	?	Uhl et al. (1992); Liu et al. (1993c)
Raxxt1	XT1-R	?	Et Mestikawy et al. (1994)
Gat1	GABAT1-M	GABA	Liu et al. (1992b)
Hsgat4nr	GABAT1-H	GABA	Nelson et al. (1990)
(Gat1	TGAT-1	GABA	Swanson et al. (1994)
Ratrnsp	TAUT-R	Taurina	Smith et al. (1992)
Taur1	TAUR-M	Taurina	Liu et al. (1992a)
Dognac1tau	TAUT-D	Taurina	Uchida et al. (1992)
Gat4	GABAT4-M	GABA	Liu et al. (1993b)

Rat3gat	GABAT4-R	GABA	Borden et al. (1992)
Gat3	GABAT3-M	GABA	Liu et al. (1993b)
Gat2	GABAT2-M	GABA	López-Corcuera et al. (1992)
Dogmcbta	BETAT-D	Betaina	Yamauchi et al. (1992)
hBgt1	BGT1-H	Betaina	Borden et al. (1995)
Protr	PROT-R	Prolina	Fiemeau et al. (1992)
tbCreaT	CRET-R	Creatina	Mayser et al. (1992), Guimbal y Kilimann (1993)
tCreaT	CRET1-T	Creatina	Guimbal y Kilimann (1994)
Crt2	CRET2-H	Creatina	Bamwell et al. (1995)
Uga4	UGA4	GABA	André et al. (1993)
Gabp	GABP	GABA	King et al. (1995)

Los transportadores "huérfanos" difieren de todos los demás miembros de la familia en tres regiones, y contienen asas extracelulares mucho más largas entre las hélices 7 y 8 y las hélices 11 y 12 (Wright et al., 1992; Amara y Kuhar, 1993; Kanner, 1994). Los transportadores de *S. cerevisiae* y *E. coli*, a pesar de ser considerados por algunos autores como permeasas, son específicos para GABA, y conservan extensas regiones de similitud con otros miembros de la familia, en especial con el transportador de colina en levadura (André et al., 1993). Por su distribución filogenética y la falta de correlación entre su similitud estructural y el sustrato que recapturan, considero que estos últimos transportadores definen una nueva subfamilia.

Algunos de los sustratos de las proteínas de recaptura pertenecientes a la superfamilia contienen grupos cargados eléctricamente. Por lo tanto, es posible que algunos aminoácidos cargados en el dominio transmembranal de los transportadores sean esenciales para su función normal. Los transportadores de las aminas biogénicas, por ejemplo, contienen un residuo cargado negativamente en la hélice 1 (aspartato-79). El reemplazo de este residuo en el transportador de dopamina por alanina, glicina o glutamato, significativamente reduce la recaptura del sustrato así como del MPP+, una neurotoxina que induce un estado similar a la enfermedad de Parkinson. Aparentemente, el aspartato-79 de la hélice 1 interactúa con el grupo amino de la dopamina durante el proceso de transporte. Las serinas-356 y 359 de la hélice 7 también participan en el pegado y traslocación de la dopamina, tal vez interactuando con los grupos hidroxilo del catecol (Kitayama et al., 1992).

Para los transportadores de GABA -en particular para el primer subtipo- se ha descubierto que sólo uno de cinco aminoácidos cargados e insertos en la membrana, la arginina-69 de la hélice 1, es absolutamente esencial para su actividad (Pantanowitz et al., 1993). No es sólo que la carga positiva sea importante, ya que también se vió que la sustitución de este residuo por otros cargados positivamente no restaura la actividad. Se piensa que el daño funcional tampoco se debe a una disminución en el recambio ni a un envío deficiente de la proteína mutada a la membrana. Los otros tres aminoácidos cargados positivamente y el único cargado negativamente no resultaron ser críticos. Es posible que el residuo de arginina-69 esté involucrado en el pegado de cloruro (Figura 6; Kanner, 1994).

Además de los aminoácidos cargados, existen aminoácidos aromáticos que contienen electrones  $\pi$ , que también podrían estar involucrados en el mantenimiento de la estructura y función de los acarreadores (Sussman y Silman, 1992). Con base en lo anterior, Kanner y Kleinberger-Doron (1994) mutaron nuevamente aminoácidos localizados en dominios

transmembranales del transportador de GABA (residuos de triptofano por serinas y leucinas). Las mutaciones de las posiciones 68 y 222 (en las hélices 1 y 4, respectivamente) inhibieron hasta en un 90% la recaptura de GABA. De acuerdo con las alineaciones de los transportadores antes mencionadas, se ha postulado que el triptofano-222 está involucrado en el pegado del grupo amino del GABA (Figura 6).

Apenas el año pasado, el grupo de Kanner hizo un estudio en el que se identificaron otros cuatro aminoácidos cargados negativamente, pero esta vez localizados a **un lado** de determinados dominios transmembranales putativos. Se trata de los residuos 52, 287 y 319 de aspartato (localizados del lado amino terminal de las hélices 1, 6 y 7) y del glutamato-101, que queda hacia el extremo carboxilo-terminal de la hélice 2. Este trabajo resulta justificado por el hecho de que a veces los perfiles de hidropatía tienen una capacidad predictiva limitada, y aminoácidos que parecen formar parte de asas de la proteína en realidad **están dentro de la membrana**. De cualquier modo, estos investigadores concluyeron que el residuo 101 de la proteína está relacionado con el pegado al sodio, pues encontraron que su reemplazo por aspartato resulta en una actividad del 1% con respecto al control, y que no se detecta actividad alguna cuando se sustituye por alanina, glicina o glutamina. El glutamato-101 podría ser crítico para el cambio conformacional de la proteína inducido al pegarse este catión, ya que la corriente entrante transitoria de sodio observable en la proteína nativa desaparece en las mutantes; alternativamente, dicho residuo podría ser importante para que el transportador descargado experimente un cambio conformacional, de manera que las proteínas mutadas se quedan fijas en la conformación que mira hacia el citoplasma (Figura 6; Keslet et al., 1995).

Así pues, en este momento contamos con información suficiente sobre los transportadores de GABA, en especial sobre la proteína GAT-1, para empezar a explicarnos las interacciones que se establecen entre esta proteína y el GABA, el Na<sup>+</sup> y el Cl<sup>-</sup>. Sin embargo, ¿es posible explicar todas las propiedades de esta proteína únicamente en términos de los aminoácidos que la componen?

**Bioquímica de los transportadores de neurotransmisores. El sistema de transporte de alta afinidad para GABA en el sistema nervioso**

#### a) Dependencia iónica

Antes de que la era de las clonaciones de proteínas acarreadoras comenzara, el principal punto de interés fue, durante años, la identificación y caracterización del proceso de transporte mediante el uso de compuestos radiactivos en ensayos de recaptura. En tiempos más recientes, las técnicas electrofisiológicas también se han utilizado para estudiar los detalles funcionales del transporte de neurotransmisores. **Los estudios bioquímicos, como el presente trabajo, son complementados por la información estructural que las técnicas moleculares han generado, y la ponen en contexto fisiológico.**

Varias preparaciones de tejido nervioso, como las rebanadas de cerebro, los "prismas" de tejido y los sinaptosomas han probado ser de invaluable ayuda para realizar la tarea mencionada arriba. Actualmente se sabe que la recaptura neta de neurotransmisores como el glutamato, la glicina, el GABA y la prolina es un proceso activo mantenido por el gradiente que se establece a través de la membrana plasmática por la ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> (Clark y Amara, 1993). Durante el influjo, diferentes especies iónicas son co- y contratransportadas simultáneamente con el sustrato, casi siempre a favor -pero en ocasiones en contra- de sus propios gradientes de concentración. Se ha demostrado, por ejemplo, que tanto el transportador de GABA como el de glicina dependen de las concentraciones extracelulares de Na<sup>+</sup> y de Cl<sup>-</sup> (Kanner, 1978; Keynan y Kanner, 1988; López-Corcuera et al., 1989). En cambio, la recaptura de glutamato depende de Na<sup>+</sup> extracelular y de K<sup>+</sup> intracelular (Kanner y Sharon, 1978; Kanner y Bendahan, 1982), pero no de las concentraciones extracelulares de Cl<sup>-</sup> (Figuras 3 y 7). Este último hallazgo implicaba una diferencia fundamental en el mecanismo de transporte que probablemente representaba que los acarreadores de glutamato pertenecían a una familia diferente de proteínas, como se indicó brevemente al inicio de esta introducción. Lo anterior

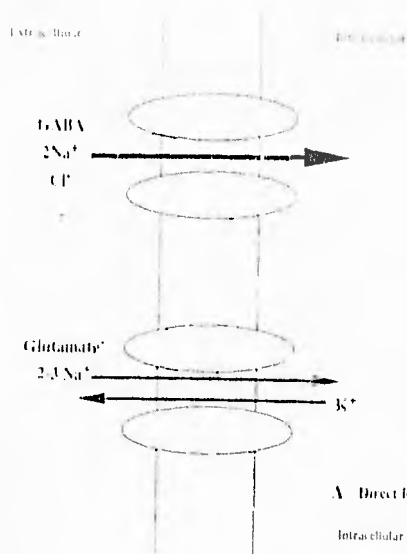
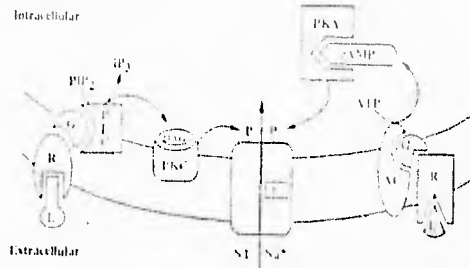


Figura 7. Estequiometrias propuestas para el transporte de GABA y de ácido glutámico. El transporte de GABA al interior de la célula se acompaña del cotransporte de 2-3 iones de sodio y un ión de cloruro. El glutamato es cotransportado junto con 2-3 iones de sodio e intercambiado por un ión de potasio. Tomado de Clark y Amara (1993).

**A Direct Regulation of Transport**



**B Indirect Regulation of Transport by Altering Ion Gradients**

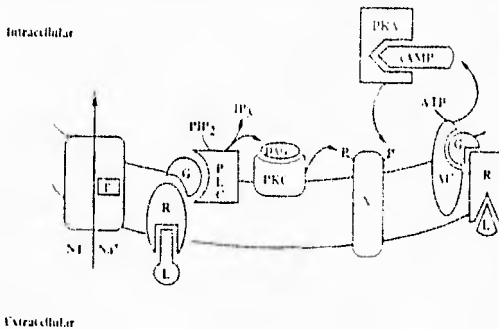


Figura 8. Modos posibles de regulación del transporte de neurotransmisores por activación de sistemas de segundos mensajeros. A: regulación por fosforilación directa de un transportador como resultado de la activación de la PKC y/o de la PKA. B: regulación indirecta del transporte por fosforilación de otras proteínas membranales (X) que modifican los gradientes iónicos. X puede representar proteínas tales como la ATPasa de sodio/potasio y/o canales iónicos. Tomado de Clark y Amara (1996).

resultó ser cierto cuando en 1992 tres grupos diferentes clonaron simultáneamente transportadores para este aminoácido excitador (Kanner et al., 1993 es una buena revisión sobre el tema) y confirmaron que las diferencias funcionales también son estructurales.

En resumen, los estudios hechos en preparaciones membranales con los transportadores de GABA y glutamato han demostrado que la recaptura de *cualquier* neurotransmisor es un proceso electrogénico. Sin embargo, existen diferencias fundamentales entre ambas clases de sistemas de recaptura, en cuanto a los iones transportados por cada uno de ellos y la dirección del transporte de los mismos se refiere. Por esta razón, ahora consideramos a estos sistemas como los principales representantes de dos superfamilias mutuamente exclusivas de genes y proteínas, con expresión preferencial en el sistema nervioso.

La electrogenicidad en los sistemas de transporte de la superfamilia GAT consiste en el cotransporte de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> junto con el sustrato al interior de la célula, que resulta en un movimiento neto de carga a través de la membrana plasmática, interpretable en términos electrofisiológicos como una corriente entrante. Para el GABA, los experimentos de medición del flujo de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> han indicado una estequiometría aparente de transporte de 2Na<sup>+</sup>:1Cl<sup>-</sup>:1GABA (Martin, 1976; Kanner, 1978 y 1983). En el artículo ya citado en el que se presentan los resultados de la clonación de GAT-1 y su expresión en ovocitos de *X. laevis* (Guastella et al., 1990) se confirmó esa proporción, pues al medir la corriente entrante asociada con la entrada de GABA a los ovocitos, se vio que por cada molécula del aminoácido ingresaba también una carga positiva. El transportador, según esos autores, tiene una alta afinidad por el GABA (7 µM). El análisis más reciente de los movimientos de carga a través de uno de los transportadores clonados ha demostrado que las corrientes de GABA se incrementan al aumentar las concentraciones extracelulares del aminoácido, así como las de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>; los potenciales crecientemente negativos también aumentan la corriente entrante. El coeficiente de Hill medido para el Na<sup>+</sup> excedió la unidad, lo cual confirma que por cada molécula de aminoácido ingresan dos de estos iones a la célula (Mager et al., 1993).

Además del transporte del neurotransmisor al interior de la terminal sináptica, el acarreador de GABA puede mediar el flujo y el intercambio de su sustrato, es decir, puede funcionar en la dirección opuesta. Entre los procesos en los cuales participa este mecanismo se encuentra la liberación del mismo GABA en sinaptosomas, con independencia de Ca<sup>2+</sup>, posterior a la estimulación con alto potasio, en sistemas como los conos de crecimiento de neuronas de rata (Nelson y Blaustein, 1982; Kanner et al., 1983; Taylor y Gordon-Weeks, 1991).

#### b) Regulación

La comprensión del modo en que trabajan los transportadores de neurotransmisores -entre los cuales sobresalen, como hemos visto, los que recapturan al GABA- puede ser útil no sólo para complementar nuestra idea de la transmisión sináptica, sino incluso para el diseño racional de drogas para el tratamiento de enfermedades como la epilepsia (Clark y Amara, 1993). Teniendo fines como éstos, es importante conocer si existen mecanismos de regulación de la actividad de estas proteínas. En las secciones que siguen, se hará evidente que hay un gran número de estos mecanismos en varios tipos de neuronas y células gliales, y que muchos de ellos van más allá de la simple estructura primaria.

En época reciente, se ha implicado a los mensajeros intracelulares como posibles elementos regulatorios de los acarreadores neuronales. Se ha visto, por ejemplo, que activadores potentes de sistemas de segundos mensajeros como el de la proteína cinasa C (PKC) regulan el transporte de GABA. Específicamente, el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) causa una inhibición del transporte de GABA en cultivos de astrocitos dependiente de la concentración y del tiempo (Gomez et al., 1991). El análisis cinético de la recaptura después del pretratamiento con PMA reveló un cambio en la constante de afinidad por

el GABA ( $K_m$ ) pero no en la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de transporte. La inhibición inducida por el PMA fué suprimida por el 117, un inhibidor de la PKC, y reproducida por el R59022, un inhibidor de la diacilglicerol (DAG) cinasa, así como por el oleoilacetilglicerol, análogo del DAG. Estos resultados han sido confirmados en sinaptosomas de corteza cerebral de rata y en ovocitos de *X. laevis*, donde se observó que el 12-*O*-tetradecanoilforbol 13-acetato (TPA), otro activador de la PKC, también inhibe la recaptura de GABA mediada por el transportador GAT-1 (Osawa et al., 1994).

La activación de los receptores para monoaminas ha sido señalada también como un elemento de modulación del transporte de GABA y otros transmisores, en cultivos primarios de glia de corteza de rata (Hansson & Rönnbäck, 1991). El tratamiento de las células con isoproterenol, un agonista del receptor  $\beta$ -adrenérgico, estimuló la recaptura de GABA. Los efectos de este agonista sobre las constantes cinéticas pudieron reproducirse con forskolina y con la toxina del cólera, y se le atribuyen a la adenilato ciclasa y a la  $G_{\alpha}$ . El transportador podría regularse de manera indirecta a través de la ATPasa de  $Na^+/K^+$  o de algún canal iónico, o bien fosforilarse directamente; el segundo caso es muy posible, pues se han identificado ya sitios putativos de fosforilación para varias cinasas en los dos subtipos de transportadores exclusivamente neuronales de GABA, el GAT-1 y el GAT-4 (equivalentes a GAT-A y a GAT-B; Guastella et al, 1990; Clark et al, 1992). También podría suceder que el transporte se afecte por cambios en el metabolismo y/o la liberación de los neurotransmisores, o que se recluten más transportadores provenientes de compartimientos intracelulares. Aunque el significado de los mecanismos de regulación *in vivo* mencionados hasta este momento no está muy claro, se ha postulado que, mediante dichos mecanismos (a) las neuronas controlan sus propias tasas de recaptura de transmisores bajo diversas circunstancias fisiológicas y (b) las células gliales modulan la actividad neuronal (Clark y Amara, 1993; Figura 8).

**Aparte de los sistemas de segundos mensajeros, se ha vuelto evidente que los lípidos juegan un papel en la regulación de la función de los transportadores de neurotransmisores.** Por ejemplo, la reconstitución funcional de estas proteínas en liposomas requiere de lípidos cerebrales. Shouffani y Kanner (1990) realizaron un estudio para encontrar qué clases de lípidos eran esenciales para la reconstitución y encontraron que el colesterol era uno de ellos; los proteoliposomas hechos con colesterol y alguno de varios otros fosfolípidos exhibieron una óptima actividad del transportador de GABA. Estos efectos del colesterol se consideran específicos e independientes del estado de fluidez de la membrana, ya que su reemplazo con análogos no afectó la recaptura. Aunque el modo de acción del colesterol aún no está claro, se ha propuesto que puede interactuar directamente con el acarreador, incluso favoreciendo la asociación de subunidades para una correcta función. Un precedente para la afirmación anterior proviene de los estudios hechos en el transportador de glucosa, del cual se piensa que funciona como un homotetrámero (Stevens et al., 1990).

**Los gangliósidos. Aspectos estructurales y funcionales que apuntan hacia un posible papel regulatorio de los sistemas de transporte de neurotransmisores**

En el presente proyecto de investigación se empleó la preparación sinaptosomal para evaluar aspectos regulatorios del sistema de transporte de alta afinidad de GABA en neuronas, y se exploró la posibilidad de que una clase particular de lípidos cerebrales funcionen como moduladores naturales de esta proteína. La primera evidencia que nos hizo pensar en este sentido fué el trabajo de Zaleska y Erecinska (1987), quienes describieron por primera vez el efecto del pretratamiento de sinaptosomas con la enzima hidrolítica neuraminidasa (NAasa), enzima con una conocida especificidad por residuos del azúcar conocido como ácido N-acetilneuramínico o ácido siálico, presentes en glicconjugados membranales. El efecto consistía en una inhibición del transporte, tanto de



GABA como de ácido aspártico, de tipo no competitivo, correlacionada con la cantidad de ácido siálico liberado por la neuraminidasa. En este trabajo se proponía que las proteínas podrían contener residuos de azúcares dentro de su estructura que serían importantes para su funcionamiento; el efecto de la neuraminidasa indicaba que el ácido siálico podría cumplir dicho papel. Posteriormente, experimentos realizados por nuestro grupo en la misma preparación involucraban nuevamente a una molécula con las características del ácido siálico membranal como la de contribuir con cargas negativas de superficie- al observarse que cuando se quelan los cationes divalentes  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  con EGTA y EDTA, la función del acarreador de GABA resulta inhibida, tal vez debido a que, bajo condiciones fisiológicas, las cargas negativas del siálico son neutralizadas por el calcio membranal, evento que podría ser indispensable para conservar la integridad de la membrana y por consiguiente del transportador (Tapia y Salazar, 1989). **En dicho trabajo se dejó abierta la cuestión de si tales residuos de ácido siálico u otro azúcar con características similares pertenecían al transportador nativo o a otras moléculas asociadas a él.**

Según lo expuesto más arriba en esta Introducción, el primer caso es posible, pues existen sitios putativos de glicosilación en el transportador clonado, así que los azúcares involucrados en la función de acarreo del GABA bien podrían ser intrínsecos a la proteína ya modificada postraduacionalmente. No obstante, la otra alternativa también es posible, ya que, como se mencionó anteriormente, el ácido siálico forma parte de glicoconjugados membranales. De ellos, los glicoconjugados conocidos como **gangliósidos** nos parecieron los mejores candidatos. A continuación intentaremos justificar nuestra elección describiendo algunas de sus características bioquímicas, así como las funciones que se les conocen y que son relevantes para los objetivos del presente proyecto de investigación.

En la actualidad se conocen aproximadamente 300 clases de glicoesfingolípidos con oligosacáridos de constitución química conocida. En general, pueden clasificarse en dos grupos (Wiegandt, 1994): (a) glicolípidos neutros y (b) glicolípidos ácidos. El segundo grupo de compuestos se distingue por la presencia de uno de cuatro sustituyentes: sulfato, ácido glucurónico, piruvato o ácido siálico. **Gangliósido es el término genérico usado para los glicoesfingolípidos que contienen ácido siálico.**

Alrededor de 70 diferentes estructuras de oligosacáridos pertenecen a gangliósidos, y cuando se toman en cuenta las variaciones en el ácido siálico, el número total de estructuras aumenta a cerca de 90. Son moléculas particularmente abundantes y complejas en el sistema nervioso de los mamíferos, aunque no de manera exclusiva; se sabe que las membranas celulares de todos los phyla de animales deuterostomados, con excepción de los tunicados, tienen entre sus componentes principales a varios tipos de gangliósidos (Rahmann, 1983). Tal vez como un reflejo de sus papeles funcionales específicos dentro de este tejido, los gangliósidos se distinguen entre los glicoconjugados de las células por el modo en que las porciones de carbohidratos se van añadiendo a la porción lipídica de la molécula; salvo algunas excepciones, se ha encontrado que el paso anabólico más temprano en la formación de un gangliósido es siempre la adición de ácido siálico a lactosilceramida ( $Galb4GlcCer \rightarrow NeuAca3Galb4GlcCer$ ). La estructura de todos los gangliósidos con actividad en el sistema nervioso resulta, en general, de la extensión de la molécula de sialil-lactosilceramida por la adición de monosacáridos activados por nucleótidos (Wiegandt, 1995).

Por otra parte, ácido siálico es a su vez el término que agrupa a un conjunto de azúcares que tienen en común un esqueleto de ácido 2-ceto-3-desoxinonónico (Wiegandt, 1994), aunque es más común leer que los ácidos siálicos son todos los derivados del ácido neuramínico. De cualquier modo, existe consenso en que son dos los tipos principales de este azúcar cargado, cuando forma parte de gangliósidos: ácido N-acetilneuramínico (NeuAc, NANA) y ácido N-glicolilneuramínico (NeuGc). Ocasionalmente, ambos tipos de ácido siálico se presentan en la misma estructura. Los gangliósidos cerebrales usualmente contienen NeuAc, aunque hay excepciones, como la neurohipófisis de bovino, en la cual existe una mayor proporción de

NeuGc. Los ácidos siálicos pueden presentarse también en formas *O*-acetiladas en el hidroxilo 4 ó 9, y en algunas formas poco comunes como la forma lactona, que es inestable bajo condiciones alcalinas, y formas sulfatadas y metiladas en el grupo hidroxilo 8 (Yu & Saito, 1989; Figura 9).

Con base en los oligosacáridos que presentan, existen cinco familias principales de gangliósidos en el tejido nervioso de los vertebrados: gala, hemato, ganglio, lacto y globo (Yu & Saito, 1989; ver Wiegandt, 1995 para una clasificación mucho más exhaustiva). La mayoría de los que se encuentran en cerebro pertenecen a la familia ganglio, caracterizada estructuralmente por la presencia de N-acetilgalactosamina (GalNAc). En la serie ganglio, tanto este azúcar como el ácido siálico están unidos al mismo residuo de galactosa, y por tanto todos sus miembros son ramificados. En esta familia se encuentran los cuatro gangliósidos más abundantes en el cerebro de los vertebrados: GM1, GD1a, GD1b y GT1b. Estas cuatro especies juntas representan entre el 80 y el 90 % de los gangliósidos totales (Yu y Saito, 1989). De acuerdo con Avrova et al. (1973), las proporciones de estas especies en membranas sinaptosomales de cerebro de rata son del 20.0, 32.7, 18.5 y 16.6 %, respectivamente, del total de gangliósidos; según Ralman (1983), los gangliósidos de la membrana sinaptosomal dan cuenta de entre el 10 y el 15 % de los lípidos totales. Los valores promedio de concentración de ácido siálico en un considerable número de fracciones sinaptosomales son de cerca de 10 µg de ácido siálico por mg de proteína, mientras que para preparaciones de membrana plasmática sináptica el valor puede llegar a 30 µg/mg prot.

La nomenclatura usada hasta el momento para distinguir entre las diferentes especies de gangliósidos se basa en la siguiente regla: en los nombres abreviados, la segunda letra indica el prefiijo correspondiente al número de siálicos presentes, y el número resulta de la sustracción del número de azúcares que no son siálico del número cinco:

número en la abreviatura del gangliósido =

5 - número de azúcares que no son ácido siálico.

La letra que aparece al final de algunas abreviaturas se refiere a la localización de los residuos de siálico con respecto al resto de los oligosacáridos.

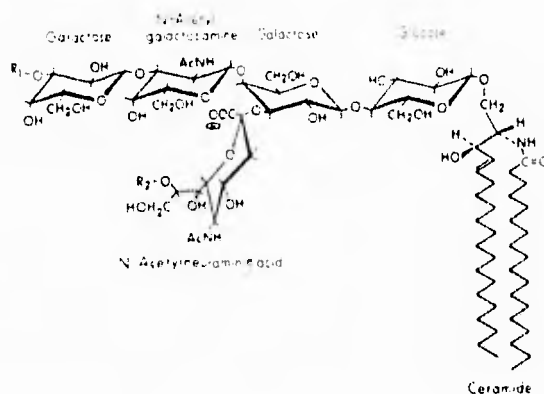
La Comisión de Nomenclatura Bioquímica de la IUPAC-IUB [J Lipid Res 19: 114 (1978)], asigna los símbolos siguientes a los cuatro principales gangliósidos del cerebro de los mamíferos:

GM1	H3NeuAc-GgOse4Cer
GD1a	IV3NeuAc,II3NeuAcGgOse4Cer
GD1b	H3(NeuAc)2-GgOse4Cer
GT1b	IV3NeuAc,II3(NeuAc)2-GgOse4Cer

La nomenclatura de Svennerholm (1963, 1980) ha sido preferida por algunos autores en lugar de la de IUPAC-IUB, tanto en revisiones como en artículos originales. En el presente trabajo, por razones de simpleza, continuaremos empleando la nomenclatura más abreviada, que incluso se usa en los libros de texto más difundidos (ver, por ejemplo, Alberts et al., 1994) al referirnos a las distintas especies de gangliósidos.

De modo esquemático, los gangliósidos del sistema nervioso central de los vertebrados se componen pues de una "cabeza" con cierto carácter hidrofílico, formada por un sialil-oligosacárido, y un "cuerpo" de carácter hidrofóbico, formado por una ceramida (es decir, una esfingosina más un ácido graso; Figura 9). Ya que esta última proporciona un sitio de anclaje a la monocapa externa de la membrana plasmática, el oligosacárido sialosilado necesariamente queda orientado hacia el espacio intersináptico. Por esta razón, los gangliósidos constituyen sitios de reconocimiento en la membrana celular, sumamente

adecuados para la interacción con una gran variedad de sustancias extracelulares. Esta es la base de su participación en funciones receptoras y de reconocimiento célula-célula y célula-sustrato. Por otro lado, son capaces de fluir libremente a través de los componentes lipídicos de la membrana y establecer contactos con proteínas integrales, modulando su actividad e influenciando la transferencia de información mediada por la membrana (Tettamanti y Riboni, 1994).



**Figura 9.** Estructuras de los cuatro principales gangliósidos del cerebro de los mamíferos. GM1, R1=R2=H; GD1a, R1=NeuAc, R2=H; GD1b, R1=H, R2=NeuAc; GT1b, R1=R2=NeuAc. Tomado de Ledeen (1985).

Si bien parece ser que, en principio, las diferencias en el comportamiento fisicoquímico y en las propiedades biológicas de los gangliósidos dependen en gran parte de las características de la porción de carbohidratos, que es sumamente variable, y en menor medida de la heterogeneidad en la constitución de la ceramida -de hecho, las diferencias más notables en la composición de la porción lipídica de los glicolípidos del tejido nervioso se han reportado únicamente en la mielina y en células de neuroblastoma- recientemente se ha observado que metabolitos de los gangliósidos como la esfingosina y la ceramida son capaces de regular actividades enzimáticas. Así pues, además de las claras implicaciones funcionales de la porción expuesta de los gangliósidos, parece que el recambio metabólico de los mismos puede ser importante en la formación de mensajeros intracelulares (Tettamanti y Riboni, 1994; Wiegandt, 1995). Los principios anteriores constituyen el fundamento general, en términos celulares y moleculares, de algunos de los fenómenos más atractivos de la bioquímica del sistema nervioso: la sinaptogénesis y la neuritogénesis mediadas por gangliósidos, así como sus propiedades neuroprotectoras en condiciones de excitotoxicidad (Ledeen, 1985; Yu y Saito, 1989; Thomas y Brewer, 1990; Nagai, 1995).

**En resumen, la justificación del presente trabajo es que existen suficientes aspectos bioquímicos de los gangliósidos que aseguran su inclusión**

en la lista de lípidos importantes para la función de los acarreadores neuronales, independientemente de que los residuos de ácido siálico importantes para la modulación de la función de estas proteínas sean o no intrínsecos. Así pues, decidimos empezar basándonos en la aproximación experimental de Zaleska y Erecínska (1987), consistente en tratar a los sinaptosomas con una sialidasa, teniendo en mente los resultados previos obtenidos mediante los experimentos de quelación de calcio (Tapia y Salazar, 1989). A la anterior, sumamos la incorporación de gangliósidos por vía exógena, mediante procedimientos de incubación. Lo que nos propusimos en esta última parte fué averiguar si es que gangliósidos exógenos son capaces de restituir la función del transportador neuronal de GABA, cuando ésta se ha desorganizado mediante la acción de sialidasas y otras glicosidasas; también analizamos el papel del calcio en el efecto inhibitorio causado por éstas, y evaluamos qué pasa en una preparación sinaptosomal intacta en cuanto a su contenido de ácido siálico y otros azúcares, a la cual se le incorporan gangliósidos exógenos. En breve, nuestros resultados parecen indicar que, tal como los estudios moleculares recientes han mostrado, existe un sitio intrínseco de modulación de la actividad del acarreador, representado por residuos de ácido siálico que potencialmente se asocian con cationes divalentes endógenos, pero también una participación de gangliósidos anclados a la membrana de diversas maneras, e inclusive de otros glucoconjugados sialosilados, en la vecindad del transportador y otros sitios, de tal manera que la presencia natural de todos estos elementos membranales resulta en una estabilización general de la bicapa lipídica de la terminal sináptica, esencial para la integridad del sistema de recaptura de GABA y muy probablemente de otras proteínas acarreadoras con características estructurales similares.

Un aspecto importante en la fundamentación de los experimentos realizados se refiere a la distribución de los gangliósidos endógenos y su posible interacción con las proteínas de la membrana neuronal, en particular con los transportadores de neurotransmisores. Asimismo, conocer el modo en que los gangliósidos exógenos pueden interactuar con la célula o con una preparación subcelular como los sinaptosomas, resulta indispensable en dicha fundamentación.

Diversos autores han elaborado hipótesis y experimentado sobre estos puntos. Entre las contribuciones más importantes a este tema están los trabajos del grupo de H. Rahmann (algunos ya citados), en especial las que se refieren a la distribución filogenética y las propiedades fisicoquímicas de los gangliósidos neuronales y su relación con los procesos de transmisión sináptica dependientes de  $Ca^{2+}$  (ver, por ejemplo, Rahmann et al., 1976; Probst et al., 1984; Rahmann et al., 1994 y Rahmann, 1995). Este grupo ha postulado un modelo según el cual, entre otras cosas, los gangliósidos endógenos son importantes durante el estado de reposo de la membrana presináptica, pues le confieren rigidez al organizarse en racimos, al igual que algunas glucoproteínas, y formar complejos mediante puentes de calcio y de hidrógeno. Esta parte del modelo es relevante porque apoya los resultados del trabajo de Tapia y Salazar (1989), que indicaban una posible interacción entre el siálico y los cationes divalentes sometidos a quelación. De manera similar, la sugerencia de Maggio et al. (1978 y 1981) en el sentido de que los polisialogangliósidos son fusógenos que auxilian a las vesículas sinápticas durante la liberación de transmisores, y que la cantidad de dichos gangliósidos fusógenos se regula mediante su asociación con proteínas, abre la posibilidad para una interacción directa con los transportadores, muy posiblemente con la participación del  $Ca^{2+}$  localizado en la vecindad de la membrana. Aún no se ha dicho la última palabra acerca de cómo es que los gangliósidos se distribuyen sobre la superficie de la célula, y evidentemente, las interacciones entre ellos y proteínas como la que nos ocupa en la presente tesis dependerán en gran parte de los detalles de su localización. Algunos investigadores han postulado que los gangliósidos no se localizan únicamente en las terminales sinápticas, sino que más bien se distribuyen de manera uniforme sobre la célula entera (Ledeen, 1978). Pero la mayor parte de las líneas de trabajo experimental

parecen indicar que los polisialogangliósidos pueden inducir la formación de dominios, es decir, de regiones enriquecidas en gangliósidos y regiones pobres en ellos; esto se ha visto al menos en membranas preparadas artificialmente, compuestas de fosfatidilcolina-gangliósido (Masserini et al., 1988), e incluso parece que los monosialogangliósidos tienen una tendencia más marcada a hacer esto (Peters et al., 1984; Ollmann et al., 1987).

En relación a los gangliósidos incorporados por incubación, los resultados obtenidos por Toffano et al. (1980) fueron nuestro punto de partida. En dicho trabajo, se estudió el pegado del gangliósido GM1 a preparaciones de membranas neuronales de cerebro de rata. La incorporación siguió una cinética bifásica, en la cual el comportamiento cambió a partir de concentraciones de GM1 de 0.07 a 0.08  $\mu$ M. Por debajo de estos valores, el proceso fué descrito como lento y condujo a una asociación estable e irreversible entre el gangliósido y la membrana, mientras que arriba de  $10^{-6}$  M el proceso fué mucho más rápido y consistió en una interacción débil, de modo que cierta concentración fué liberable mediante lavado y pudo intercambiarse con gangliósido incorporado posteriormente. Como se encontró que en ambos casos el GM1 incorporado reaccionaba con la galactosa oxidasa, se concluyó que las cadenas de oligosacáridos efectivamente se orientaban hacia el espacio extracelular a partir de la monocapa externa. Para explicar las diferencias en la cinética, los autores postularon que, por arriba del valor ya mencionado, el gangliósido interactúa en forma de micelas que se fusionan a la membrana, mientras que a concentraciones más bajas la incorporación resulta de las interacciones hidrofóbicas entre sitios de la membrana y la porción hidrofóbica de moléculas individuales de gangliósido, posiblemente en forma de monómeros. Recientemente, Saqr et al. (1993) han hecho una revisión exhaustiva de los trabajos que se han realizado a la fecha con distintas preparaciones en las cuales se ha tratado de incorporar gangliósidos. De ella, se ha desprendido que los dos factores más importantes para lograr la incorporación son la concentración del gangliósido en el medio de incubación y el tiempo de la misma. En principio, nosotros seguimos el protocolo de incubación de Toffano et al. (1980) el cual, según la revisión ya citada, es el primer trabajo de incorporación de gangliósidos hecho en una preparación de membranas neuronales, pero posteriormente nos apartamos de las concentraciones usadas por ellos debido a que no pudimos encontrar el efecto deseado en los primeros ensayos, como se describirá en la parte de Resultados. Cabe señalar en este momento que, en los trabajos aludidos, se emplearon gangliósidos marcados radiativamente y la incorporación se determinó directamente, a diferencia del presente trabajo.

Nosotros estimamos la incorporación de manera indirecta, tanto cualitativa como cuantitativamente. El primer tipo de estimación consiste simplemente en asumir que cualquier disminución o aumento en la recaptura de GABA a través del transportador neuronal, implica necesariamente que una cierta proporción del gangliósido exógeno que se ha incorporado de manera estable a la membrana después de la incubación; el segundo tipo de estimación se basa en las fórmulas empíricas obtenidas por Saqr et al. (1993), aproximadas a partir del análisis de la literatura referente a las interacciones de diversas especies de gangliósidos con diversos tipos de células en cultivo y preparaciones subcelulares de membranas.

Entre los efectos que causa la incorporación de gangliósidos exógenos (específicamente GM1) sobre las funciones de la maquinaria bioquímica neuronal que nos interesan aquí, está la estimulación de un mecanismo de transporte de ácido glutámico, estudiado en preparaciones de membranas sinápticas crudas y purificadas de cerebro de rata. En un principio, se creyó que este proceso era más bien una unión del aminoácido a sus receptores (Hollmann y Seifert, 1986 y 1989). El cambio en la interpretación del efecto estimulador se debió a los siguientes factores, todos ellos característicos de un proceso de recaptura: su notable dependencia de la temperatura, su desaparición completa cuando eran usadas condiciones de hiperosmolaridad, y el hecho de que las preparaciones presentaron vesículas reselladas. De acuerdo con estos autores, esto último es un requisito para cualquier proceso de transporte. Es importante decir que se trata de

un proceso inusual, porque es independiente de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$ , y además el efecto del GM1 se presenta únicamente en presencia de  $\text{Ca}^{2+}$ , el cual por sí mismo también estimula el transporte (Hollmann et al., 1988). De modo similar, mediante experimentos realizados en el ganglio cervical superior y el ganglio nodoso de la rata, en los cuales se incorporaron los gangliósidos GM1, GM2 y GD1a, se han demostrado efectos sobre la recaptura de aminoácidos, en particular del ácido alfa-aminoisobutírico (AIB; Nagata et al., 1987). En este trabajo, se encontró que el GM1 estimula la recaptura del AIB en el ganglio nodoso, mientras que el mismo gangliósido inhibe al transportador del ganglio cervical superior. La explicación ofrecida por los autores para este efecto desigual del GM1 se basa en posibles diferencias en los sistemas de segundos mensajeros mediados por receptores entre ambas preparaciones; en particular, el GM1 podría modular la función de los receptores para factores de crecimiento a través de afectar su grado de fosforilación, el cual modificaría la afinidad del receptor por el factor de crecimiento correspondiente. Por último, recientemente se ha reportado que el sistema de recaptura de alta afinidad de colina también es modulado por gangliósidos (Maysinger et al., 1992), evidencia que es de particular interés para el presente trabajo y que se describirá en detalle en la Discusión.

Para fundamentar el otro aspecto básico para el diseño de los experimentos de la presente tesis, el que se refiere a las enzimas usadas para la modificación del patrón de residuos de ácido siálico membranaral que posiblemente participan en el proceso de transporte de GABA, se tomaron en cuenta algunas de las características generales del catabolismo de los gangliósidos, entre las que se encuentran las siguientes:

La degradación de los gangliósidos procede por pasos separados, en cada uno de los cuales se liberan carbohidratos individuales en el orden inverso a como se realiza la síntesis. La mayoría de las enzimas en la vía catabólica tienen rasgos que las identifican como proteínas de origen lisosomal: su sedimentación se produce entre las 800 y 15000 g; su actividad es mayor en presencia de detergentes y funcionan mejor a pHs ácidos. El grupo de enzimas más común de degradación de gangliósidos es el de las sialidasas, dentro del cual está la neuraminidasa empleada en el trabajo, citado ya en varias ocasiones, que, entre otros, usamos como base para planear el presente proyecto de investigación (Zaleska y Erecinska, 1987). Las sialidasas ocurren en compartimentos lisosomales así como fuera de los lisosomas; entre estas últimas están las membranas sinápticas (Schengrund y Rosenberg, 1970; Tettamanti et al., 1972). En estos sitios, las enzimas pueden catalizar la hidrólisis de gangliósidos endógenos así como de exógenos. Considerando que una sialidasa puede coexistir con su sustrato natural en la misma membrana plasmática, es interesante preguntarse cómo es que no todo el tiempo los gangliósidos se están hidrolizando; parece ser que una posibilidad es que el gangliósido se asocie con otras proteínas membranales que funcionan como un escudo. Un ejemplo de lo anterior lo proporciona el GM4 que, en presencia de la proteína básica de la mielina, queda protegido de la neuraminidasa (Yohe et al., 1983).

El catabolismo de los principales oligosialogangliósidos del cerebro comienza con el rompimiento de los ácidos siálicos terminales, catalizado por alguna sialidasa. Tal como se ha dicho antes, implícitamente, las neuraminidasas provenientes de distintas fuentes se han usado exitosamente para la alteración de los gangliósidos de la superficie celular y para provocar cambios en su actividad biológica. Por ejemplo, la incubación de rebanadas de hipocampo de rata con neuraminidasa incrementa la magnitud de la potenciación de la respuesta sináptica registrada en la capa de células piramidales, posterior a una estimulación de alta frecuencia de las fibras colaterales de Schaffer (Wieraszko y Seifert, 1985). En el cerebro humano, se ha encontrado una sialidasa cuyo sustrato es GT1b, y que lo degrada preferentemente a GD1b en vez de a GD1a, indicando que la porción sialosilgalactosil puede ser más susceptible que la disialosil (Ohman et al., 1970). En contraste, el hecho de que el disialosil del GT1b reaccione con mayor rapidez que el GD1b que se forma después sugiere que para este último compuesto existe un impedimento estérico de la enzima (Ando y Yu, 1977). Otro ejemplo de impedimento estérico de las sialidasas es la limitación que presenta la mayor parte de las neuraminidasas de animales y bacterias a hidrolizar el ácido siálico de los monosialogangliósidos GM1 y GM2: a








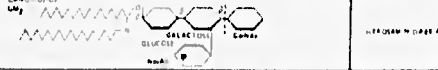

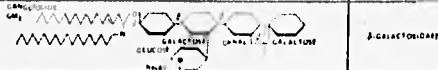
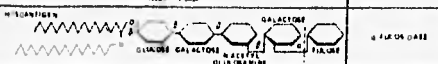
MAJOR LIPID ACCUMULATION	ENZYME DEFECT
	SPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE
	GLUCOSYLSPHINGASE

Figura 10. Localización de los sitios de hidrólisis correspondientes a varios glucoesfingolípidos y glicosidasas de interés para el presente trabajo. Tomado de Brady (1978).

ese impedimento se le ha llamado "jaula de oxígeno", y se supone que consiste en un arreglo de la molécula de gangliósido, en la vecindad del enlace cetosídico del ácido siálico, que impide que la neuraminidasa lo hidrolíce (Schauer et al., 1980). Existe un consenso acerca de que el tratamiento de células vivas o de preparaciones subcelulares con esta enzima causa varios cambios en los glucoconjugados de superficie: la remoción del ácido siálico de glucoproteínas; la conversión de los miembros polisialosilados de la serie gangliotetraosa a GM1; la reducción en el contenido de gangliósidos pertenecientes a las otras series, por ejemplo, hemato, neolacto y globo, sin un incremento correspondiente en algún monosialogangliósido de dichas series; y por último, un aumento en la concentración de glucoesfingolípidos neutros como la lactosilceramida (LacCer; Wu y Ledeen, 1991). Entre las neuraminidasas más empleadas en el trabajo experimental, se encuentran las que provienen de *Vibrio cholerae* y de *Clostridium perfringens*. Ambas presentan, bajo condiciones regulares, el impedimento estérico descrito anteriormente, y las preparaciones donde se usan presentan los cambios ya mencionados.

Después de la hidrólisis de los todos los siálicos posibles, hasta que la preparación queda enriquecida en el monosialogangliósido GM1, la principal vía de degradación parece ser hacia GM2, y de este compuesto hacia GM3. Este gangliósido es otra vez susceptible de modificación por una neuraminidasa, pues las barreras estéricas ya no existen en GM3. El

primer paso en la degradación de GM1 involucra a la  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal); se conocen dos genes distintos para la misma, cuyos productos se localizan en los lisosomas, y de ellos uno hidroliza GM1 y el otro galactosilceramida (GalCer; Suzuki et al., 1980).

Una vez que se ha formado GM2, el producto es procesado nuevamente, esta vez por la N-acetil- $\beta$ -hexosaminidasa, hacia GM3. Esta enzima lisosomal cataliza la hidrólisis de residuos de  $\beta$ -GalNeuAc o de  $\beta$ -GlcNeuAc localizados en los extremos no reductores de los gangliósidos, glucolípidos neutros y glucoproteínas. Existen dos isoenzimas, formadas por la asociación de dos subunidades peptídicas. La hexosaminidasa A es un dímero en el cual las dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , son estructuralmente muy parecidas, mientras que la hexosaminidasa B es un homodímero de dos subunidades  $\beta$  (Sandhoff et al., 1989). Ambas enzimas actúan sobre glucoproteínas, mientras que sólo la A tiene actividad sobre gangliósidos.

Según lo anterior, entonces, a partir de una preparación enriquecida en GM1 por la acción de una neuraminidasa, sólo existe una manera de hacer que los monosialogangliósidos sean hidrolizados nuevamente por ella: usar secuencialmente una  $\beta$ -galactosidasa y una hexosaminidasa. Sin embargo, en el presente trabajo nosotros nos limitamos al uso de neuraminidasa y  $\beta$ -galactosidasa, en concentraciones que fueran mutuamente comparables, para descartar en lo posible otros efectos sobre el acarreador de GABA que pudieran deberse a la hidrólisis de azúcares no pertenecientes a gangliósidos. Decimos "en lo posible" porque, como se puede leer en la Discusión, tal vez el efecto que encontramos para la  $\beta$ -galactosidasa no necesariamente resulta de la hidrólisis de siálicos de gangliósidos; esta afirmación se basa en el tipo de enlaces glicosídicos que, potencialmente, la enzima empleada por nosotros puede cortar (Dwek et al., 1993). Sin embargo, pensamos que nuestra elección de tales dos enzimas es razonable: de acuerdo con Brady (1978), "(...) debido a que el GM2 está ramificado en su parte terminal, dos vías de degradación son posibles en principio, a saber: (la primera) a través de la acción de una neuraminidasa que catalice la hidrólisis de NeuAc ó (a través de) una hexosaminidasa que rompa la molécula de GalNAc (...)" Así pues, en principio es posible hidrolizar la totalidad de los ácidos siálicos de una preparación subcelular -además, por supuesto, de un cierto número de azúcares diferentes asociados a otros glicoconjugados- usando únicamente una neuraminidasa y una  $\beta$ -galactosidasa (Figura 10).



## OBJETIVOS

A continuación se enumeran los objetivos particulares del presente trabajo de investigación.

1. Reproducir los resultados obtenidos por Zaleska y Erecinska (1987), quienes encontraron que (a) la cantidad de ácido siálico liberado de una preparación sinaptosomal, incubada con la enzima hidrolítica neuraminidasa, es directamente proporcional al porcentaje de inhibición de la actividad de los transportadores de ácido aspártico y de ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) y (b) que la inhibición de la recaptura, producida por dicha enzima, es de tipo no competitivo.
2. Evaluar la actividad del transportador de GABA en sinaptosomas, bajo condiciones de quelación de cationes divalentes endógenos, e incubados con neuraminidasa. La quelación de dichos cationes inhibe la actividad del transportador de modo reversible (Tapia y Salazar, 1989).
3. Evaluar el efecto de la incorporación a la membrana sinaptosomal de dos diferentes gangliósidos exógenos, GM1 (un monosialogangliósido) y GT1b (un trisialogangliósido) sobre la recaptura de GABA, tanto en preparaciones incubadas previamente con neuraminidasa como en otras intactas.
4. Evaluar el efecto de la  $\beta$ -galactosidasa, una glucosidasa con actividad hidrolítica sobre gangliósidos y otros glicconjugados, individualmente y en combinación con la neuraminidasa, en la misma preparación subcelular.
5. Con el mismo protocolo de incubación enzimática usado en los experimentos descritos arriba, determinar la cantidad de ácido siálico liberado por ambas enzimas.
6. Estimar de manera indirecta pero cuantitativa la concentración de gangliósidos incorporados por vía exógena a las membranas sinaptosomales empleadas para estudiar la función del acarreador de GABA.

## MATERIALES Y METODOS

### Materiales

A lo largo de todo el estudio, se emplearon ratones de la cepa Swiss, adultos y de sexo masculino, provenientes del bioterio del Instituto de Fisiología Celular, UNAM. Los ratones fueron sacrificados por decapitación. Los siguientes reactivos fueron adquiridos de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO): [ $^3$ H]GABA (actividad específica =80 Ci/mmol), neuraminidasa (de *V. cholerae*),  $\beta$ -galactosidasa (de *E. coli*), y las sustancias empleadas en el ensayo del ácido tiobarbitúrico.

### Preparación de fracciones sinaptosomales y ensayos de recaptura de [ $^3$ H]GABA

En todos los casos, se usaron sinaptosomas obtenidos a partir de uno ó dos cerebros de ratón, previamente desprovistos del cerebelo, el tallo cerebral y los bulbos olfatorios. Se siguió un protocolo basado en el método empleado por Löscher (1985), que se describe a continuación:

1. Homogenización de los cerebros en 2 ml de sacarosa 0.32 M, pH 7, mediante el uso de homogenizadores de cristal y mazos de teflón adaptables a un taladro de velocidad controlada. Este y todos los pasos siguientes del protocolo se realizaron, en la medida de lo posible, con los tubos dentro de un recipiente con hielo, en rotores previamente refrigerados y en centrifugas con una temperatura de aproximadamente 4°C.
2. Centrifugación del homogenado. Condiciones: 1000xg por 10 min en una centrifuga de baja velocidad.
3. Centrifugación del sobrenadante obtenido en el paso 2, usando como colchón un volumen de 1 ml de sacarosa 1.2 M, en una ultracentrifuga, a una velocidad de 218000xg y con una  $\omega^2$  de  $1.6 \times 10^{10}$  rad $^2$ /s, y empleando aceleración y desaceleración lentas.
4. Resuspensión de la fase intermedia obtenida en el paso 3, usando un volumen total de 2 ml de sacarosa 0.32 M.
5. Centrifugación de la resuspensión del paso 4 en un colchón de 1 ml de sacarosa 0.8 M, empleando las mismas condiciones del paso 3.
6. Resuspensión del precipitado en 0.5 ml de buffer Krebs/Henseleit /Hepes (KHH) modificado\*, adicionado con glucosa 0.32 M, empleando dicho volumen por cada cerebro utilizado.

Los sinaptosomas obtenidos de esta manera se usaron de manera inmediata en los ensayos de recaptura de [ $^3$ H]GABA. El protocolo de estos ensayos es el siguiente:

- 1a. Incubación de alícuotas de 0.25 ml de una preparación sinaptosomal fresca, a una temperatura de 37°C durante 20 min, en ausencia o presencia de neuraminidasa (0.04 U/ mg prot),  $\beta$ -galactosidasa (0.1 U/ mg prot) o ambas enzimas. Este paso se realizó en aquellos experimentos en que se estudió el efecto de la hidrólisis de los residuos de ácido siálico sobre la recaptura del aminoácido. En los experimentos de quelación de cationes divalentes, tanto el CaCl $_2$  como el MgSO $_4$  fueron sustituidos por EGTA 100  $\mu$ M.
- 1b. Incubación de alícuotas de 0.25 ml de una preparación sinaptosomal fresca, a una temperatura de 37°C durante 10 min, en ausencia o presencia de los gangliósidos GM1 (150, 400, 800  $\mu$ M y 1.6 mM) y GT1b (800  $\mu$ M). Este paso se realizó en aquellos experimentos en que se estudió el efecto que sobre la recaptura del aminoácido tiene la incorporación de gangliósidos exógenos a la membrana sinaptosomal.

2a y b. Incubación adicional durante 10 min de las alícuotas del paso previo, a 37°C, en un volumen final de 2.5 ml de buffer KHH modificado, sustituyendo al CaCl<sub>2</sub> y al MgSO<sub>4</sub> por EGTA en los experimentos de quelación de cationes divalentes.

3. Adición de una alícuota de 50 µl de [<sup>3</sup>H]GABA (0.83 mCi; concentración final=0.5 µM) a los volúmenes de incubación del paso anterior.

4. Extracción por duplicado de alícuotas de 0.4 ml, tomadas a los 60 s, 2 y 4 min, en todos los experimentos excepto en los de cinética de la actividad de la NAasa. En estos últimos, se tomaron idénticas alícuotas únicamente a los 2 min, y la concentración final de GABA cubrió el siguiente conjunto de valores: 0.1, 0.5, 2, 7 y 15 µM.

5. Filtración inmediata de las alícuotas en condiciones de vacío, sobre filtros Millipore de nitrocelulosa de 0.65 µm de poro.

6. Lavado inmediato por duplicado con 5 ml del buffer KHH.

7. Disolución de los filtros en 5 ml de Tritosol (Fricke, 1975) por cada uno, en viales individuales.

8. Cuento del contenido de radiactividad (en cuentas por minuto) en un contador de centelleo líquido.

Debido a que los valores control mostraron variación de una preparación de tejido a otra, los ensayos bajo condiciones experimentales siempre se llevaron a cabo en paralelo con un control, utilizando la misma preparación sinaptosomal. Después de corregir la lectura del contador de centelleo (que mide las cuentas por minuto) en base a la eficiencia de conteo, se graficaron los resultados, expresándose como picomolas de GABA capturado por mg de proteína, en función del tiempo.

#### **Métodos de determinación de ácido siálico y de proteína**

La determinación de la cantidad de ácido siálico hidrolizado por las enzimas empleadas en el presente estudio fue realizada siguiendo las modificaciones hechas por Zaleska y Erecinska (1987) al método de Warren (1959). El protocolo usado fue, pues, el siguiente:

1. Precipitación de la proteína contenida en alícuotas de sinaptosomas (1-2 mg de proteína) previamente incubados en ausencia o presencia de NAasa y β-gal, a las concentraciones arriba mencionadas, mediante el uso de ácido tricloroacético al 10%.

2. Centrifugación (8000xg, 10 min) del volumen total obtenido del paso anterior.

3. Resuspensión del precipitado del paso 2 en 1.5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05M e hidrólisis a 80°C, durante 1.5 hr.

4. Centrifugación de la resuspensión del paso previo, bajo las mismas condiciones del paso 2.

5. A una alícuota de 0.2 ml del sobrenadante del paso 4, adición de 0.1 ml de periodato de sodio 0.2 M, disuelto en ácido fosfórico 9 M. Los tubos se agitaron a temperatura ambiente durante 20 min.

6. Adición de 1 ml de arsenito de sodio al 10%, disuelto en una solución de sulfato de sodio 0.5 M- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1 N. Los tubos se agitaron hasta desaparecer el color amarillento de la solución.

7. Adición de 3 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.6%, disuelto en sulfato de sodio 0.5 M. Los tubos se agitaron y cubrieron con canicas, para después ponerse en un baño María con agua hirviendo durante 15 min.

8. Incubación por 5 min en hielo de la solución del paso previo.

9. Transferencia de 1 ml de la solución del paso 6 a un volumen de 1 ml de ciclohexanona.

10. Agitación de la solución anterior y centrifugación durante 3 min en centrífuga clínica.

11. Determinación de la absorbancia de la fase orgánica, a 549 nm.

La cantidad de ácido siálico liberado se calcula según la siguiente ecuación:

$$\text{mmol de ácido N-acetilneuramínico=} \\ (V)(\text{abs})/57= (4.3)(\text{abs})/57= (0.075)(\text{abs})$$

Los ensayos de determinación de la cantidad de proteína presente en las preparaciones sinaptosomales siguieron el método de Lowry et al.(1951).

### **Pruebas estadísticas**

La técnica estadística usada en el presente estudio fue el análisis de varianza (ANOVA) de una vía, y la prueba para establecer los intervalos de confianza de los resultados fue la prueba de Fisher de la diferencia mínima significativa. La base conceptual de estos métodos puede consultarse en Infante y Zárate (1984). Las pruebas se realizaron en el paquete estadístico para computadora Number Cruncher Statistical System (NCSS).

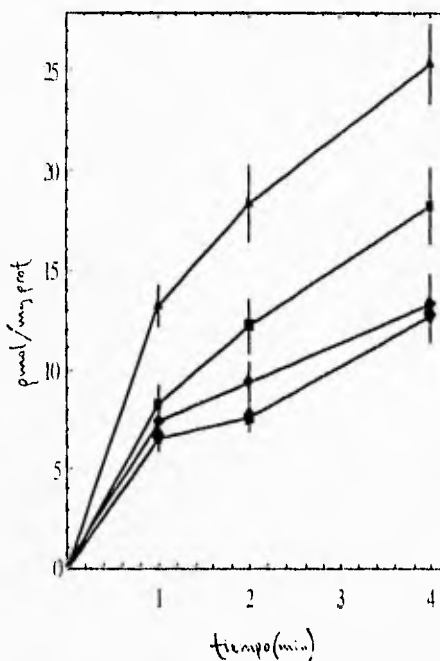
Las diferencias estadísticamente significativas están debidamente indicadas en el texto y los pies de figura correspondientes a la sección de Resultados.

## RESULTADOS

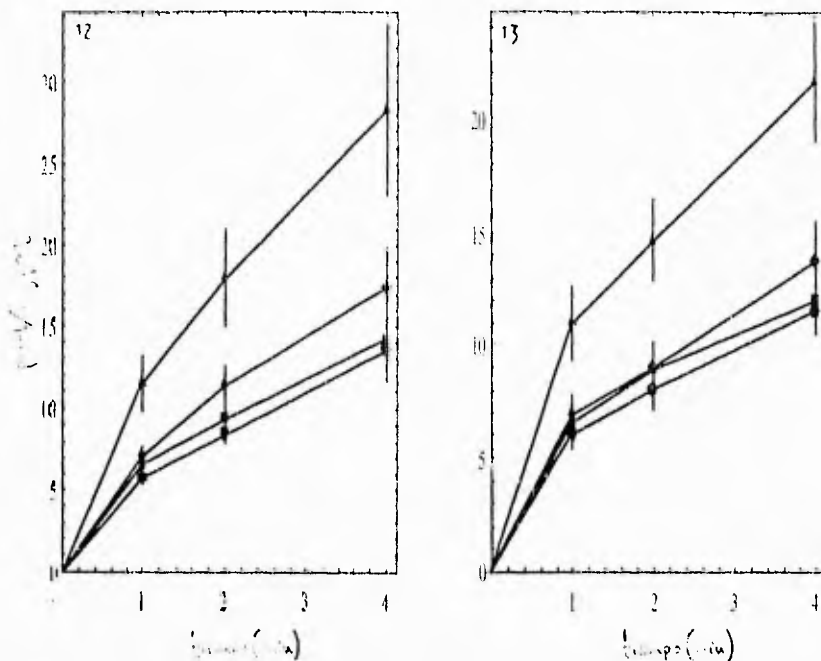
### Efecto de la neuraminidasa, el EGTA y los gangliósidos exógenos sobre la recaptura de GABA

Tal como se muestra en la **Figura 11**, el tratamiento de los sinaptosomas con neuraminidasa, previo a la incubación con [<sup>3</sup>H]GABA, resulta en una inhibición de cerca del 35% de la recaptura en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> (n=20). Cuando ambos cationes fueron omitidos del medio de incubación, la adición de EGTA, un quelante de cationes divalentes, incrementó el grado de inhibición hasta un 45% (n=10). En estos experimentos, la preincubación con neuraminidasa siempre se realizó en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. La ausencia de estos cationes en todos los medios de preincubación provocó una inhibición ligeramente mayor (55%; n=4).

La adición de 150 μM de GM1 no tuvo efecto sobre la captura, hubiera o no Ca<sup>2+</sup> en el medio de incubación (n=6, **Figura 12**). Los niveles de recaptura de GABA únicamente bajo condiciones de quelación del calcio endógeno tampoco fueron distintos de los observados en presencia del gangliósido. Con la finalidad de definir si la composición de residuos de ácido siálico de los gangliósidos determina el incremento en la actividad del acarreador o bien el efecto inhibitorio, se hicieron ensayos de recaptura con sinaptosomas incubados en presencia del trisialogangliósido GT1b, a la misma concentración.



**Figura 11.** Efecto de la neuraminidasa (NAasa; 0.04 U/ mg prot) y del EGTA (100 μM) sobre la recaptura de GABA en sinaptosomas de cerebro de ratón. Triángulos: sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas tratados con NAasa en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup>; rombos: sinaptosomas tratados con NAasa en presencia de EGTA durante la incubación con [<sup>3</sup>H]GABA; hexágonos: sinaptosomas tratados con NAasa en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> durante todas las incubaciones. Cada punto representa el valor medio de 20 (triángulos y cuadrados), 10 (rombos) y 4 (hexágonos) experimentos independientes ± error standard. El efecto de la neuraminidasa fue significativo estadísticamente (p<0.05; ANOVA de una vía, prueba de Fisher de la Diferencia Mínima Significativa), mientras que el efecto de la quelación del calcio no lo fue (p>0.1).



**Figura 12.** Efecto de la NAasa, el EGTA y el GM1 (150 μM) sobre la recaptura de GABA en sinaptosomas. Triángulos: sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas tratados con NAasa en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> así como en presencia de GM1; rombos: sinaptosomas tratados con NAasa en presencia de EGTA durante la incubación con [<sup>3</sup>H]GABA; hexágonos: sinaptosomas tratados con NAasa en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> durante todas las incubaciones y en presencia de GM1. Únicamente es significativo el efecto de la NAasa (p<0.05).

**Figura 13.** Efecto de la NAasa, el EGTA y el GT1b (150 μM) sobre la recaptura de GABA. Triángulos: sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas tratados con NAasa en presencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> así como en presencia de GT1b; rombos: sinaptosomas tratados con NAasa en presencia de EGTA durante la incubación con [<sup>3</sup>H]GABA; hexágonos: sinaptosomas tratados con NAasa en ausencia de Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> durante todas las incubaciones y en presencia de GT1b. De manera similar a como sucedió con el monosialogangliósido, el efecto de protector del GT1b no es significativo estadísticamente (p>0.1). En ambas Figuras se grafican los valores promedio de seis experimentos independientes ± error standard.

Como se puede observar en la **Figura 13**, esta concentración de GT1b fué totalmente insuficiente para proteger del efecto de la quelación. Cuando fue añadido en presencia de Ca<sup>2+</sup>, se observó un pequeño efecto de protección (alrededor del 20%; n=6), no significativo estadísticamente.

Como se mencionó en la Introducción, Toffano et al (1980) describieron una cinética de incorporación de gangliósidos exógenos (en particular GM1) en membranas de neuronas, según la cual, en el rango de interacción en forma micelar, los gangliósidos se asocian a la membrana de manera estable a partir de los 5 minutos de incubación y hasta los 30 minutos, al menos. La concentración elegida para los experimentos arriba descritos (150 μM) corresponde a una incorporación de cerca de 30 nmol/mg prot de GM1 en el artículo citado; en vista de que en nuestro sistema dicha concentración fué insuficiente para encontrar un efecto significativo sobre

la recaptura de GABA, la incrementamos hasta 400  $\mu$ M, que es la siguiente concentración empleada por Toffano y colaboradores, y que corresponde aproximadamente a 50 nmol/ mg prot de GM1 incorporadas de manera estable a la membrana. Cabe señalar que la concentración de gangliósidos endógenos calculada en la preparación usada en dicho trabajo es de cerca de 25 nmol/mg prot.

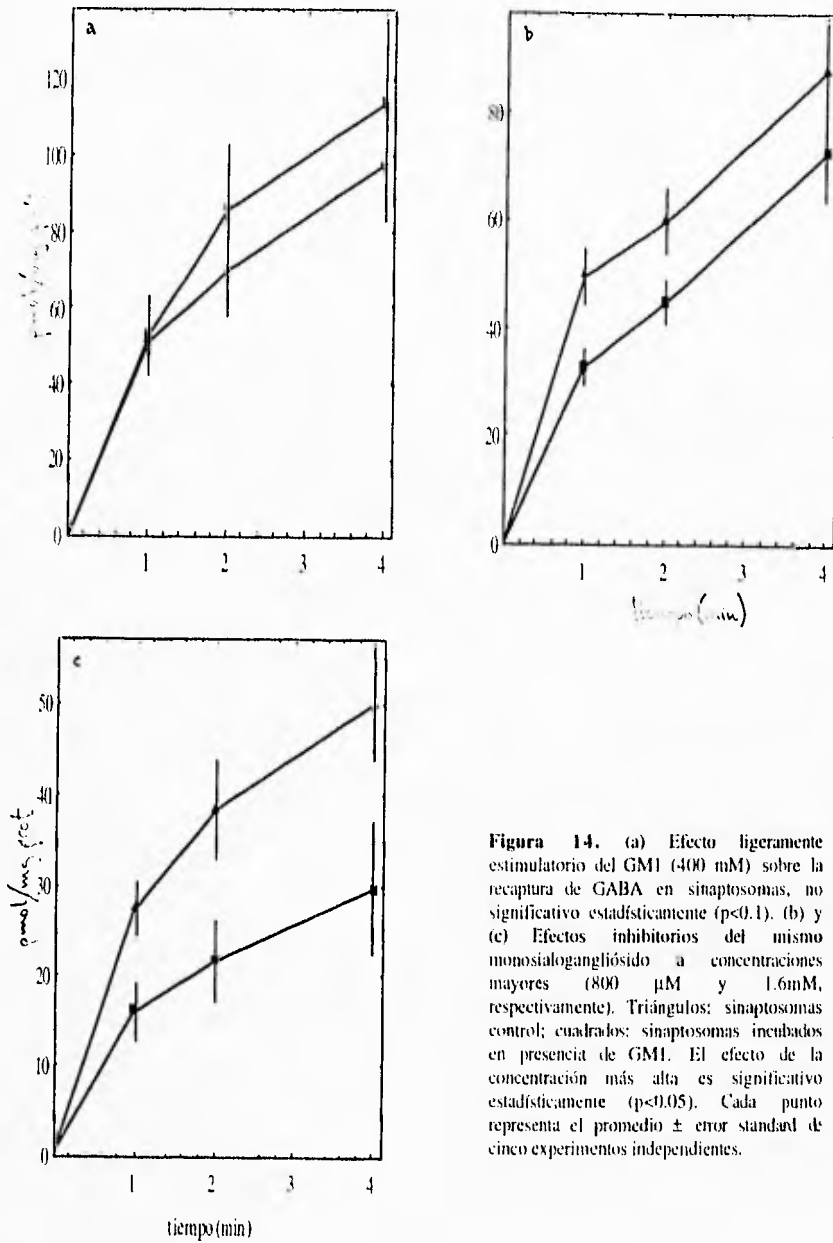
El empleo de GM1 400  $\mu$ M estimula ligeramente la recaptura (menos del 20 %; **Figura 14a**). Bajo el supuesto de que existe una relación lineal entre la proporción de gangliósidos incorporados en la membrana y la actividad de los acarreadores, aumentamos la concentración de GM1. Sin embargo, concentraciones mayores de dicho gangliósido inhiben considerablemente la actividad del acarreador en vez de aumentarla: el efecto inhibitorio es de alrededor del 25% con 800  $\mu$ M y mayor del 40% al emplear una concentración de 1.6 nM (**Figuras 14b y 14c**). El efecto de esta última concentración fué estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ). Apparently, los polisialogangliósidos exógenos no modifican la actividad del acarreador de GABA aún cuando se incuben a concentraciones relativamente altas; el tratamiento de los sinaptosomas con 800  $\mu$ M de un GT1b no afecta en absoluto el curso temporal de la recaptura del neurotransmisor (**Figura 15**;  $n=5$ ).

#### **Cinética del proceso de transporte. Efecto de la neuraminidasa**

La **Figura 16** representa el efecto inhibitorio de la neuraminidasa sobre la recaptura de GABA a diferentes concentraciones de [3H]GABA entre 0.1 y 15  $\mu$ M. Los porcentajes de inhibición para el transporte en sinaptosomas tratados con neuraminidasa se muestran en la **Tabla III**, así como las constantes cinéticas, obtenidas mediante un análisis gráfico de dobles recíprocas (**Figura 17**). Puede observarse que la inhibición en la actividad del acarreador es de tipo no competitivo, ya que el tratamiento enzimático disminuye los valores de  $V_{max}$ , sin afectar la  $K_m$ . La concentración utilizada de neuraminidasa (0.04 U/mg prot) cae dentro del conjunto de valores empleado por Zaleska y Erecinska (1987); en dicho trabajo, la recaptura se midió con una concentración constante de GABA marcado (2  $\mu$ M), variando la concentración de neuraminidasa desde 0.00125 hasta 0.05 U/ mg de proteína sinaptosomal; el porcentaje de inhibición reportado por estas autoras es del 60%, idéntico al encontrado en el presente trabajo. Todas las diferencias de la **Figura 16** son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).

#### **Efecto de la beta-galactosidasa sobre la recaptura, en ausencia y en presencia de neuraminidasa**

Con la finalidad de probar la posible participación de otros tipos de residuos de azúcar en la función del acarreador de GABA, así como la respuesta de los gangliósidos endógenos a una glicosidasa sin especificidad por residuos de ácido siálico, preparaciones sinaptosomales fueron tratadas con la enzima  $\beta$ -galactosidasa ( $\beta$ -gal) de *E. coli*, a una concentración de 0.1 U/ mg prot. Esta enzima tiene una especificidad por los enlaces glicosídicos Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc (Dwek et al., 1993), los cuales pueden encontrarse tanto en gangliósidos como en otras clases de glicoproteínas. Como se indica en la **Figura 18**, la  $\beta$ -gal inesperadamente modula el proceso de transporte en dirección opuesta al efecto de la NAasa, aumentándolo significativamente, alrededor del 70% ( $n=8$ ,  $p < 0.05$ ). Los resultados del tratamiento de



**Figura 14.** (a) Efecto ligeramente estimulador del GM1 (400 nM) sobre la recaptura de GABA en sinaptosomas, no significativo estadísticamente ( $p < 0.1$ ). (b) y (c) Efectos inhibitorios del mismo monosialogangliósido a concentraciones mayores (800  $\mu$ M y 1.6mM, respectivamente). Triángulos: sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas incubados en presencia de GM1. El efecto de la concentración más alta es significativo estadísticamente ( $p < 0.05$ ). Cada punto representa el promedio  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes.



sinaptosomas con ambas enzimas (Figura 19), muestran que el incremento en la actividad del acarreador se revierte parcialmente. Bajo estas condiciones, el porcentaje de aumento de la recaptura es únicamente del 15% (n=7). Cabe mencionar que estos experimentos se realizaron siempre en presencia de  $Ca^{2+}$  en los medios de incubación.

#### Determinación de la cantidad de ácido siálico liberado por las enzimas

Para la determinación de la cantidad de ácido siálico libre proveniente de la hidrólisis realizada por las enzimas utilizadas en el presente trabajo, se tomaron alícuotas de suspensiones sinaptosomales (1.5 mg prot), previamente incubadas con o sin NAasa o  $\beta$ -gal, a las mismas concentraciones empleadas antes, y se trataron como se describe en Zaleska y Erecinska (1987). Posteriormente, los sobrenadantes resultantes fueron sometidos al ensayo del ácido iobarbitúrico (Warren, 1959; ver Materiales y Métodos). Bajo estas condiciones, la NAasa hidroliza  $10.22 \pm 1.24$  mol de ácido N-acetilneuramínico (n=3). Por otra parte, fue imposible detectar producto libre alguno a partir de sinaptosomas pretratados con  $\beta$ -gal. Ambos resultados están de acuerdo con la literatura (Zaleska y Erecinska, 1987; Norden et al., 1974).

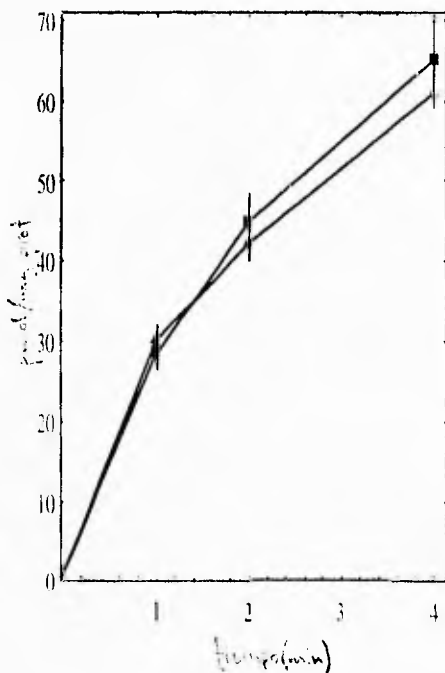
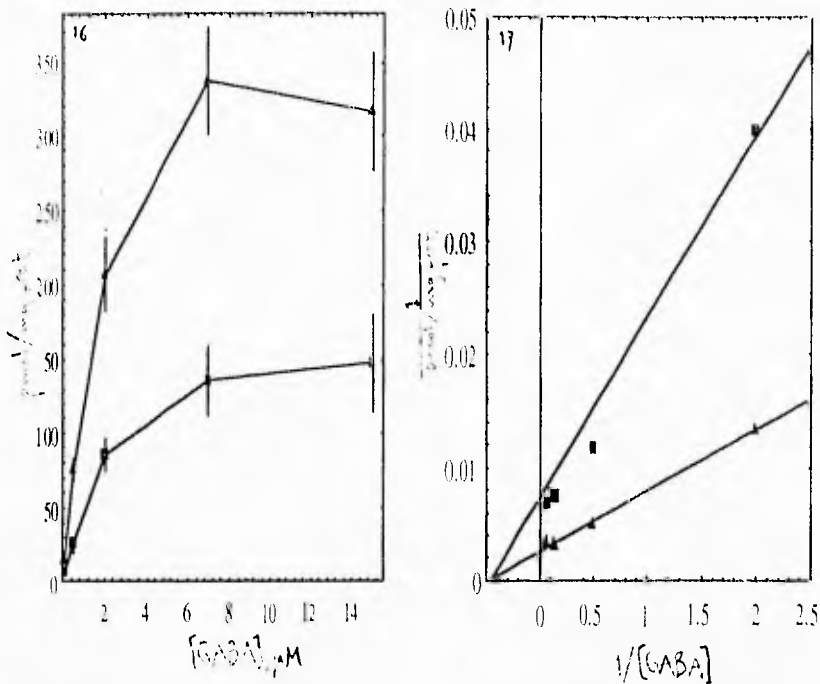


Figura 15. Efecto nulo del GT1b (800  $\mu$ M) sobre la recaptura de GABA en sinaptosomas. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  error standard de cinco experimentos independientes. Evidentemente, no existe diferencia alguna entre las dos condiciones. Triángulos: sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas incubados en presencia de GT1b.



**Figura 16.** Cinética del efecto inhibitorio de la NAasa sobre la recaptura de GABA en sinaptosomas. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  error standard de 7-10 experimentos independientes. Todos los valores experimentales (cuadrados) son diferentes significativamente ( $p < 0.05$ ) de sus correspondientes controles (triángulos).

**Figura 17.** Gráfica de doble recíproca obtenida a partir de los datos de la Figura 16. Los valores de  $V_{max}$  y de  $K_m$  correspondientes están indicados en la Tabla III.

### Estimación de la cantidad de gangliósido incorporado a la membrana sináptica

Como se mencionó en la Introducción, en el presente trabajo se ha supuesto que siempre que se modifica el curso temporal de la recaptura de GABA después de la incubación de la preparación sináptica con una determinada concentración de gangliósido, tal modificación es debida a que cierta proporción del gangliósido incubado se incorpora de modo permanente y/o estable a la membrana, y que dicha interacción incide directamente sobre el funcionamiento de la proteína. Con la finalidad de hacer cuantitativa esta relación, en el presente trabajo se aplicaron los ajustes empíricos obtenidos por Saqr et al. (1993) para determinar la cantidad de GM1 y GT1b incorporados a las preparaciones de membranas sinápticas portadoras del acarreador de GABA. En particular, se empleó la relación obtenida por estos autores para preparaciones de membrana (basada en los datos de Callies et al., 1977; Toffano et al., 1980 y Leon et al., 1981):

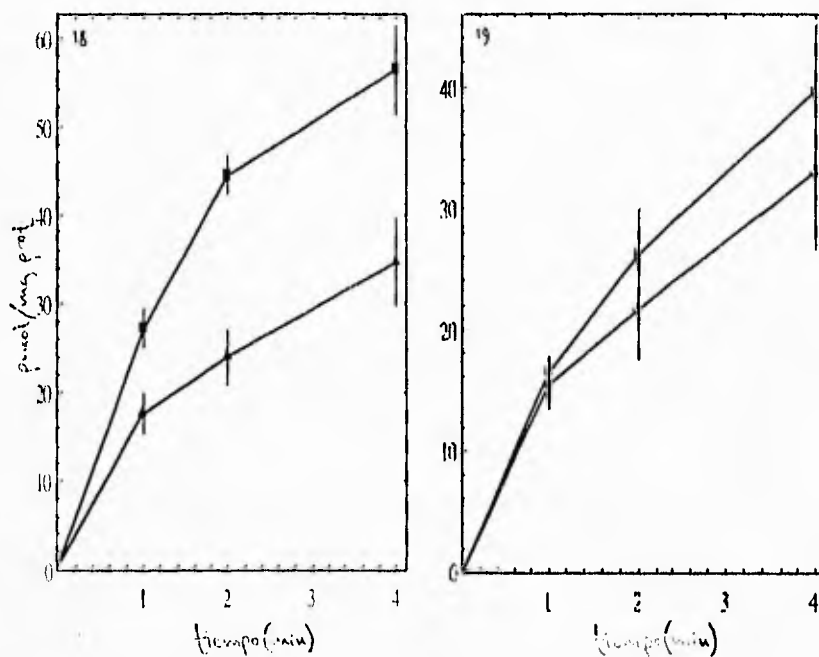
$$\log [\text{cantidad de GM1 incorporado (pmol/mg prot)}] = -0.797 + 0.93 \log [\text{concentración de GM1 (nM)}] + 0.267 \log [\text{tiempo de incubación del GM1 (min)}]$$

Las concentraciones de gangliósidos usados en el presente trabajo fueron las siguientes:

GM1: 150, 400, 800  $\mu\text{M}$  y 1.6 mM.

GT1b: 150 y 800  $\mu\text{M}$ .

El periodo de incubación de los gangliósidos que se pretendió incorporar por la vía exógena siempre fué de 10 minutos (ver Materiales y Métodos).



**Figura 18.** Efecto inhibitorio de la  $\beta$ -gal (0.1 U/mg prot) sobre la recaptura de GABA en sinaptosomas. Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  error standard de ocho experimentos independientes. Triángulos; sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas tratados con  $\beta$ -gal. El efecto de esta enzima es significativo estadísticamente ( $p < 0.05$ ).

**Figura 19.** Reversión parcial del efecto inhibitorio de la  $\beta$ -gal (0.1 U/mg prot) mediado por NAasa (0.04 U/mg prot). Cada punto representa el valor promedio  $\pm$  error standard de siete experimentos independientes. Triángulos: sinaptosomas control; cuadrados: sinaptosomas tratados con NAasa y  $\beta$ -gal. El efecto protector de esta última enzima no es significativo estadísticamente ( $p > 0.1$ ).

Los resultados de aplicar la ecuación arriba descrita son los siguientes:

GM1 150  $\mu$ M: 19.22 nmol/mg prot

400  $\mu$ M: 47.85 nmol/mg prot

800  $\mu$ M: 91.17 nmol/mg prot

1.6 mM: 173.71 nmol/mg prot

Debido a que esta ecuación no incluye entre sus variables al número de residuos de ácido siálico del gangliósido, en principio hemos asumido que las proporciones de GT1b exógeno a cierta concentración incorporadas a la membrana de los sinaptosomas podrían ser aproximadamente las mismas que se incorporan de GM1 a las concentraciones correspondientes; sin embargo, esto podría no ser cierto. El análisis hecho por Saqr y colaboradores (1993) de la incorporación total a membranas del monosialogangliósido GM3 reportada en dos trabajos (Callies et al., 1977 y Schwarzmann et al., 1983) realizados en diferentes laboratorios resulta en una diferente ecuación de ajuste a la descrita anteriormente para la interacción del GM1 con las membranas celulares, de modo que para determinar la cantidad de GT1b incorporado a membranas de manera análoga a como se ha hecho con el GM1, es necesario contar con una mayor cantidad de datos experimentales, que a la fecha no está disponible.

Tabla III. Porcentajes de inhibición de la recaptura de GABA en sinaptosomas incubados con neuraminidasa (0.04 U/mg prot), a diferentes concentraciones de [ <sup>3</sup> H]GABA.							
[GABA], $\mu$ M	0.1	0.5	2	7	15	$V_{max}$ y $K_m$ sinaptosomas control	$V_{max}$ y $K_m$ sinaptosomas tratados con NAasa
porcentaje de inhibición, %	53.0	66.6	58.7	59.8	53.4	41.66 pmol/mg prot; 2.29 $\mu$ M	15.87 pmol/mg prot; 2.16 $\mu$ M

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, hemos investigado los sitios posibles de modulación del transportador neuronal de alta afinidad para el ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) por residuos de ácido siálico pertenecientes a gangliósidos ó independientes de ellos. Para este propósito, se pusieron en práctica dos estrategias experimentales complementarias:

i) modificaciones enzimáticas del patrón de residuos de ácido siálico asociados a la membrana, mediante el empleo de enzimas con diferentes grados de especificidad en su capacidad de hidrolizar éstos y otros residuos de azúcares, que a su vez son susceptibles de encontrarse asociados a muy diversos componentes de la membrana celular, y

ii) ensayos de incorporación de dos especies diferentes de gangliósidos, consistentes en su incubación *in vitro* a temperatura fisiológica durante periodos de tiempo suficientes para permitir su asociación con los fosfolípidos de la membrana, asociación que puede ser de diferentes tipos.

En ambas estrategias se emplearon preparaciones sinaptosomales aisladas según procedimientos previamente establecidos (Löschner et al. 1985) para recuperar membranas sinápticas con una proporción de transportadores funcionales de GABA sensible a manipulaciones experimentales. Asimismo, la combinación de estrategias implica que antes de la realización del presente estudio no estábamos seguros de la localización exacta de los residuos de ácido siálico que parecían participar en la recaptura de GABA, así como tampoco estábamos seguros de que fuese el único tipo de azúcar involucrado en dicho proceso.

La primera de las enzimas utilizadas en la estrategia (i) del presente trabajo es la N-acetilneuraminato glicohidrolasa, conocida también con el nombre de neuraminidasa (EC 3. 2. 1. 18). Las fuentes tradicionales de esta enzima han sido las especies bacterianas *Vibrio cholerae* y *Clostridium perfringens*; el primer trabajo con la enzima fué hecho con la proveniente de la segunda especie (McCrea, 1947), y su actividad específica sobre gangliósidos fué reportada por vez primera por Burton en 1963. En tiempos más recientes, la enzima obtenida de este bacilo sigue siendo muy empleada en neuroquímica y existen incluso otras fuentes de la misma, como *Arthrobacter ureafaciens* (Hechler et al, 1990). Sin embargo, para conservar en la medida de lo posible las mismas condiciones experimentales del multitudinario trabajo de Zaleska y Erecinska (1987), en el presente trabajo se empleó la neuraminidasa extraída de *V. cholerae*. De ese modo se reprodujeron correctamente los resultados obtenidos por estas autoras en lo que respecta al transportador de GABA. Estos resultados son:

a) una inhibición del transporte del aminoácido al tratar a una preparación sinaptosomal con neuraminidasa a una concentración fija (0.04 U/mg prot; 60% de inhibición, Figuras 11-13) y

b) una modificación de los parámetros cinéticos, propia de una inhibición no competitiva (disminución de la  $V_{max}$ , mismo valor de la  $K_m$ ; Figuras 16 y 17).

De acuerdo con estas autoras, dichos resultados deberían ser interpretados como prueba de que "tanto el transportador de GABA como el de aminoácidos ácidos están glicosilados, además de que el ácido siálico constituye una parte integral del mecanismo de transporte" (p. 1711). Del mismo modo, ellas proponen que los residuos de ácido siálico cargados negativamente "forman parte del sitio de pegado para el  $Na^+$ , o bien, alternativamente, están involucrados en la conformación activa del acarreador que pega el catión" (p. 1712). En cuanto a la glicosilación de los acarreadores, los trabajos recientes de caracterización molecular de la familia GAT parecen indicar que un rasgo común a todos sus miembros es la presencia de una

larga asa extracelular entre los dominios transmembranales 3 y 4, con 3 (en realidad de 2 a 4) sitios putativos de glicosilación; así pues, es probable que el acarreador de GABA y los transportadores neuronales dependientes de sodio sí posean residuos intrínsecos de ácido siálico en su porción más expuesta al espacio intersináptico. Mas aún, si bien en la actualidad se conocen cuatro variantes moleculares del sistema de recaptura de GABA en el cerebro del ratón (GAT1, 2, 3 y 4; Liu et al., 1993), lo cual establece sin duda su diversidad en cuanto a sitios de expresión en el cerebro, es posible que algunas diferencias farmacológicas adicionales residan en patrones diferenciales de glicosilación. Aún no se sabe si éste es el caso para las diferentes proteínas de transporte de GABA caracterizadas hasta ahora, pero para un transportador cercanamente relacionado, el de dopamina, se ha demostrado que las diferencias en el peso molecular del acarreador proveniente del núcleo accumbens de la rata con respecto al que se encuentra en el estriado (Lew et al., 1991), desaparecen cuando se les desglicosila (Lew et al., 1992). En este sentido, parece lógico intentar una purificación y reconstitución funcional de estos transportadores desglicosilados con el objeto de comprobar si realmente la recaptura del neurotransmisor resulta afectada. La importancia de estos experimentos radica en que separaría los efectos de la modificación de los residuos de siálico potencialmente constitutivos del acarreador, de los efectos de la modificación del patrón de residuos de ácido siálico constitutivos de gangliósidos y otros gliconjugados endógenos, cosa que, por cierto, es imposible lograr bajo las condiciones experimentales empleadas en el presente trabajo.

Como se ha mencionado antes, el hecho de que los transportadores deben adquirir tanto los dos iones de sodio (ver Mager et al., 1993, para la revisión más reciente acerca de la estequiometría del transporte) como el aminoácido para llevar a cabo una traslocación eficiente del sustrato, ha sido ya ampliamente comprobado (Wheeler, 1980; Nelson y Blaustein, 1982). Pero la existencia de los sitios de glicosilación intrínsecos a la proteína no demuestra que formen o pertenezcan al sitio de pegado del sodio (segunda parte de la hipótesis de Zaleska y Erecinska). De hecho, se sospecha que esa porción de los transportadores está compuesta por las regiones de mayor similitud de secuencia, y el asa extracelular es justamente una de las regiones que presenta mayor variabilidad dentro de la proteína. Pero entonces, ¿qué parte de la proteína pega al sodio? Esta pregunta parece difícil de contestar por el momento, pues incluso el dominio putativo de pegado de sodio que se encontró en el transportador bacteriano de glutamato, basado en una región definida de similitud de secuencia de aminoácidos presente en varios cotransportadores de sodio (Deguchi et al., 1990), no se encuentra en ningún miembro de la familia de transportadores de neurotransmisores. Ahora bien, estos motivos comunes no necesariamente tienen que existir, pues aunque todos los transportadores de neurotransmisores cotransportan sodio, la estequiometría ión-transmisor y la codependencia del cloruro extracelular, principalmente, difieren entre varios miembros de la familia así como en relación a otros cotransportadores (Amara y Kuhar, 1993).

Por otra parte, los efectos adicionales -inhibitorios- ejercidos por el quelante de calcio EGTA, simultáneamente con la ausencia de cationes divalentes y con el tratamiento enzimático, aunque pequeños, se ajustan bien con la hipótesis de la neutralización de las cargas negativas y positivas presentes en la superficie membranal. Estas cargas están representadas por los cationes y los residuos de ácido siálico, respectivamente (Tapia y Salazar, 1989). Sin embargo, esta hipótesis no requiere que los residuos de ácido siálico que participan en el transporte estén directamente sobre el transportador. Por esa razón, la estrategia (ii) es válida porque implica que la función del acarreador de GABA puede reconstituirse o modularse por siálicos localizados en diferentes lugares de la membrana, que obviamente corresponden a los sitios donde los gangliósidos aplicados por vía exógena han logrado incorporarse a la membrana.

Los resultados obtenidos siguiendo esta estrategia se pueden interpretar como sigue: Las propiedades anfífilas de los gangliósidos exógenos usados en el presente trabajo les permiten formar micelas no esféricas (Cantu et al., 1986) en soluciones acuosas, porque las concentraciones usadas están por arriba de la concentración micelar crítica. Las micelas de gangliósidos existen en equilibrio con sus monómeros. Por esta razón, los gangliósidos asociados a la membrana pueden encontrarse (a) como moléculas individuales insertas con la ceramida dentro de la matriz de fosfolípidos, (b) adsorbidas como micelas completas, ó (c) de ambas maneras. Incluso, la membrana puede adsorber gangliósidos individuales (Saqr et al., 1993). De cualquier manera, las micelas tienden a fusionarse con los fosfolípidos de la membrana conforme pasa el tiempo (Tettamanti et al., 1980). En nuestro sistema, la concentración más baja utilizada (150  $\mu\text{M}$ ) de ambos gangliósidos fué insuficiente para proteger de manera significativa del efecto de "rasurado" de ácido siálico membranaral. El pequeño efecto conseguido con el GT1b puede atribuirse a las dos cargas negativas adicionales que posee cada molécula de trisialogangliósido; evidentemente, este efecto estabilizador de la membrana sólo aparece cuando el calcio está presente. Más aún, la ausencia de un mayor efecto protector de los gangliósidos puede deberse al hecho de que el calcio es necesario para que los glicolípidos sean incorporados por la membrana, fenómeno documentado ya para monosialogangliósidos en timocitos (Krishnaraj et al., 1980).

Si la poza endógena de gangliósidos permanece intacto, la incubación con moléculas exógenas, en presencia de calcio, necesariamente debe conducir a un incremento en la concentración de los mismos. De igual forma, es muy probable que el modo de asociación con la membrana sea en forma de micelas adsorbidas. La observación de que las concentraciones altas de GM1 tienen efectos inhibitorios sobre la recaptura puede explicarse mediante alguno de los siguientes mecanismos:

a) Un cambio en la forma de la membrana causado por la adsorción de las micelas, que constituye un impedimento estérreo para proteínas transportadoras previamente expuestas, o bien una regulación inhibitoria directa de los acarreadores por su asociación con los gangliósidos. Este efecto inhibitorio se incrementaría de manera directamente proporcional a la concentración de gangliósido asociado, pero también dependería del tipo de gangliósido que forma la micela, pues concentraciones equivalentes de diferentes glicolípidos tienen efectos diferentes (comparar Figuras 14b y 15). De hecho, el tamaño de las micelas decrece de manera considerable al incrementarse el contenido de ácido siálico de los gangliósidos (Yohe y Rosenberg, 1972), así que las micelas de GT1b constituirían un menor impedimento para el proceso de recaptura. Una variante de este argumento descansa en la posible existencia de proteínas membranales que pegan gangliósidos (Fueshko y Schengrund, 1990; Sonnino et al., 1992), ubicadas en la vecindad de los transportadores de GABA, que impedirían una recaptura apropiada del aminoácido mediante el pegado de gangliósidos en grandes cantidades que bloquearan el sitio de pegado para sodio, que como ya hemos dicho antes, no reside únicamente en el glutamato-101 de la proteína pero tampoco exclusivamente en los residuos putativos de ácido siálico del transportador, aunque claramente ambos sitios sean importantes para la función de la proteína. Por otra parte, para dar cuenta de lo anterior no es necesario suponer un cambio considerable en la forma de la membrana en su conjunto. Según este argumento, el efecto diferencial del GM1 con respecto al GT1b incubados a la misma concentración relativamente alta (800  $\mu\text{M}$ ) se debería a la ausencia de una proteína que pega el trisialogangliósido. En cualquier caso, un exceso de gangliósido asociado a la membrana sería suficiente para modificar el equilibrio de cargas en su superficie, en virtud de las cargas negativas de los residuos de ácido siálico, tal como postularon Tapia y Salazar (1989). Sin embargo, persiste un problema con este último escenario: el mayor efecto inhibitorio debería esperarse con un gangliósido asociado que tuviese más cargas negativas, caso contrario a lo que se encontró en el presente estudio.

Existen en principio dos alternativas para describir la distribución de los gangliósidos en la membrana neuronal: una distribución homogénea, y una distribución en dominios o parches. Recientemente se ha observado, por medio de microscopía electrónica, que los gangliósidos se agregan en microareas o dominios de membrana (ver Rösner et al., 1992 y las demás referencias citadas en la Introducción); estos datos sugieren que además de una libre difusión en el plano de la membrana pueden existir asociaciones reversibles de los gangliósidos con proteínas de la membrana. Esta relación se ha demostrado para receptores de factores de crecimiento (Bremer et al., 1986) y para moléculas de la matriz extracelular (Cheresh et al., 1986). En resumen, es bastante probable que una vez que los gangliósidos de insertan a la membrana, comiencen a interactuar de manera directa con proteínas funcionales debido a fenómenos de agregación y de separación de fases, que se han demostrado fisicoquímicamente en diversos sistemas de membranas artificiales (ver Schifferer et al., 1989 y referencias relacionadas citadas en la Introducción).

**b) Un posible efecto metabólico, mediado por la modificación en la estructura de la proteína por el lado que mira hacia el citoplasma.** Los transportadores de neurotransmisores clonados hasta fechas recientes presentan residuos de serina y treonina que podrían ser sustratos para la fosforilación en el extremo citoplásmico (Amara y Kuhar, 1993). Estas autoras plantearon un modelo en el cual los acarreadores son modulados directamente por fosforilación, sin aclarar si se trata de una modulación positiva o negativa. Al parecer, cuando estos residuos son fosforilados la recaptura se inhibe, lo cual tiene como consecuencia la prolongación de potenciales postsinápticos, que son inhibitorios en el caso de la modulación del transportador GAT1 (Osawa et al., 1994). Puede especularse que cierta proporción de gangliósidos internalizados tal vez es suficiente para interferir con actividades de fosforilación; de hecho, en algunos sistemas se ha observado que los gangliósidos son capaces de inhibir la actividad de cinasas (Kim et al., 1986); sin embargo, si este fuese el caso, el transporte debería favorecerse, a menos que algunas cinasas diferentes de la PKC a su vez aumentaran la actividad de los acarreadores en vez de inhibirla. De cualquier manera, parece poco probable que la internalización de los gangliósidos pudiese interrumpir un proceso metabólico de este tipo en nuestro sistema, porque los tiempos observados para estas actividades son del orden de horas (Sagr et al., 1993).

**c) Un efecto desestabilizador de la membrana producido por la neuraminidasa, que sólo puede ser revertido si los gangliósidos se incuban antes o al mismo tiempo que la enzima.** Como mencionamos en la Introducción, Maysinger et al. (1992) han encontrado que la inhibición del sistema de recaptura de alta afinidad para la colina (HACU) en sinaptosomas de cerebro de rata, causada por derivados del hemicolinio-3, es revertida por GM1, incubado en presencia de concentraciones similares a las usadas en el presente trabajo. En este sistema, queda claro que el efecto protector del gangliósido es totalmente dependiente de el orden de incubación de las sustancias, pues desaparece si la toxina es aplicada antes del glicolípido. Es concebible que la interacción de la toxina y los componentes de la membrana sea irreversible y que la adición subsecuente de GM1 no pueda producir una recuperación completa de la HACU; en otras palabras, la inserción previa de GM1 a la membrana sinaptosomal hace a las terminales aisladas más resistentes al daño por neurotoxinas y, nosotros creemos, al efecto desestabilizador de cargas de superficie ejercido por sialidasas.

En el presente trabajo, la hidrólisis de los residuos de ácido siálico siempre se hizo antes que la inserción de los gangliósidos a las membranas sinaptosomales. Es muy posible que la inversión de este orden, es decir, la incubación de sinaptosomas con gangliósidos exógenos previa a la exposición a neuraminidasa, eliminase el efecto inhibitorio que esta enzima causa sobre el sistema de recaptura de alta afinidad para GABA.



Como se mencionó en la Introducción, la  $\beta$ -galactosidasa, enzima que ha sido purificada de cerebro y de hígado (Gatt y Rapport, 1966; Norden et al., 1974) tiene actividad sobre GM1, pero que no consiste en la liberación de ácido siálico: en estos trabajos los únicos productos detectados fueron galactosa y GM2. Más aún, parece que esta hidrólisis es realizada por una  $\beta$ -galactosidasa específica. En este momento, ignoramos si la enzima que proviene de *E. coli* -que hemos usado en el presente trabajo- tiene un espectro de actividad suficientemente amplio como para hidrolizar el residuo galactosil-terminal del GM1, convirtiéndolo en GM2, pero si lo hace, también podría estar hidrolizando residuos de asialo-GM1, lactosilceramida y galactosilceramida, todos ellos productos del catabolismo de los gangliósidos en la membrana así como en los lisosomas (Suzuki et al., 1980; Tetamanti, 1984; Dwek et al., 1993).

La neuraminidasa de *V. cholerae* no es capaz, según el consenso general, de hidrolizar al ácido siálico de los monosialogangliósidos GM1 y GM2; en otras palabras, la mayoría de los investigadores consideran que la neuraminidasa cataliza la hidrólisis de ciertos residuos de ácido N-acetilneuramínico de di- y trisialogangliósidos para dar como producto final de la reacción al monosialogangliósido GM1, que no puede seguir siendo hidrolizado (Schauer et al., 1980; Ledeen, 1989). Esto se debe a la formación de un impedimento estérico llamado "jaula de oxígeno", que consiste en que el sialil "interno", ligado a una galactosa cis-3,4 sustituida, es inaccesible al sitio activo de la enzima porque la N-acetilgalactosamina unida a la posición 4 de la galactosa le estorba. Esto ya había sido establecido desde 1963 (Burton, op. cit.) y es la base de que la neuraminidasa se emplee como una enzima que sirve para enriquecer el contenido de monosialogangliósidos, especialmente de GM1, presentes en cualquier preparación de membranas neuronales (ver, por ejemplo, Wu y Ledeen, 1991). Sin embargo, durante los setentas se publicaron dos evidencias independientes de que la neuraminidasa puede tener actividad sobre GM2 in vitro (Tallman y Brady, 1972; Wenger y Wardell, 1973). Así pues, si bien la enzima más apropiada para hidrolizar el sialil del GM2 es una hexosaminidasa (Brady, 1978), las dos enzimas usadas en el presente trabajo pueden ser consideradas como las más importantes en el catabolismo de todos los gangliósidos: en primer término, la neuraminidasa, con actividad de **sialidasa** sobre polisialogangliósidos, GM3 y probablemente GM2, y en segundo lugar la  $\beta$ -galactosidasa, con actividad de **glicosidasa** sobre GM1, galactosil- y lactosilceramida.

La notable estimulación del sistema de recaptura de GABA encontrada en el presente trabajo al incubar la preparación con la enzima  $\beta$ -galactosidasa de *E. coli* puede entenderse como una consecuencia de que la membrana sinaptosomal queda despejada de una porción de azúcares de superficie que potencialmente pueden interferir con la interacción de los transportadores con sus sustratos (es decir, transportadores GAT con el GABA), a manera de un impedimento estérico generalizado. En principio, estos azúcares no estarían cargados, y por lo tanto el equilibrio de cargas de la membrana no se modifica. Como se esperaba, la  $\beta$ -gal no hidroliza residuos de siálico, lo cual es una evidencia indirecta de que las proteínas probablemente poseen esta clase de azúcares de manera intrínseca, manteniéndolas funcionales todo el tiempo al formar complejos con cationes divalentes. Por otro lado, el efecto que se observa cuando los sinaptosomas se incuban simultáneamente con ambas enzimas implica justamente la participación de los residuos de siálico intrínsecos al acarreador: el efecto inhibitorio de la NAasa, antagónico al de la  $\beta$ -gal cuando se incuban juntas, es proporcionalmente muy similar al obtenido cuando sólo se usa la sialidasa (aproximadamente 55%; Zaleska y Erecinska, 1987 y el presente trabajo). **Inclusive, como hemos dicho antes de manera implícita, el efecto de la NAasa de *V. cholerae* podría ser mayor si asumimos que es capaz de hidrolizar el último sialil del GM2 después de su conversión a partir de GM1, mediada por la  $\beta$ -gal de *E. coli*.**

En resumen, la utilización de estas dos enzimas, aisladas y en conjunto, permite disectar dos procesos separados de modulación de la actividad del acarreador:

a)  $\beta$ -galactosidasa: un efecto mecánico de exposición de sitios de pegado de sustratos de la proteína, independiente de cargas de superficie; y

b) neuraminidasa: un efecto electrostático, mediado por la remoción de azúcares cargados negativamente, intrínsecos al acarreador glicosilado, que bajo condiciones normales interactúan con cationes divalentes, lo que se traduce en una inhibición de tipo no competitivo de la actividad de la proteína.

Evidentemente, para tener una idea más completa de las características del efecto de la  $\beta$ -galactosidasa es necesario realizar experimentos de cinética similares a los hechos con neuraminidasa.

## REFERENCIAS

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994): Molecular biology of the cell. Third edition. New York: Garland.
- Amara SG, Kuhar MJ (1993): Neurotransmitter transporters: recent progress. *Annu Rev Neurosci* 16: 73-93.
- André B, Hein C, Grenson M, Jauniaux J-C (1993): Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible GABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* 237: 17-25.
- Avrova NF, Chenyakaeva EY, Obukhova EL (1973): Ganglioside composition and content of rat brain subcellular fractions. *J Neurochem* 20: 997-1004.
- Barnwell LFS, Chaudhuri G, Townsel JG (1995): Cloning and sequencing of a cDNA encoding a novel member of the human brain GABA/noradrenaline neurotransmitter transporter family. *Gene* 159: 287-288.
- Blakely RD, Berson HE, Fremear RT, Caron MG, Peek MM, Prince HK, Bradley CC (1991): Cloning and expression of a functional serotonin transporter from rat brain. *Nature* 354: 66-70.
- Borden LA, Smith KE, Hartig PR, Branchek TA, Weinshank RL (1992): Molecular heterogeneity of the  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) transport system. *J Biol Chem* 267: 21098-21104.
- Borden LA, Smith KE, Gustafson EL, Branchek TA, Weinshank RL (1995): Cloning and expression of a betaine/GABA transporter from human brain. *J Neurochem* 64: 977-984.
- Bremer EG, Schlessinger J, Hakomori S (1986): Ganglioside-mediated modulation of cell growth. *J Biol Chem* 261: 2434-2440.
- Brady RO (1978): Sphingolipidoses. *Annu Rev Biochem* 47: 687-713.
- Burton RM (1963): *J Neurochem* 10: 503; citado en Wenger y Wardell (1973).
- Cantu L, Corti M, Sonnino S, Tettamanti G (1986): Light-scattering measurement on gangliosides: dependence of micellar properties on molecular structure and temperature. *Chem Phys Lipids* 41: 315-328.
- Clark JA, Amara SG (1993): Amino acid neurotransmitter transporters: structure, function, and molecular diversity. *Bioessays* 15: 323-332.
- Cheresh DA, Pierschbacher MD, Herzig MA, Mujoo K (1986): Disialogangliosides GD2 and GD3 are involved in attachment of human melanoma and neuroblastoma cells to extracellular matrix proteins. *J Cell Biol* 102: 688-696.
- Dwek RA, Edge CJ, Harvey DJ, Wormald MR, Parekh RB (1991): Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu Rev Biochem* 62: 65-100.
- El Mestikawy S, Giros B, Pohl M, Hamon M, Kingsmore SF, Seldin MF, Caron MG (1994): Characterization of an atypical member of the Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent transporter family:

- chromosomal localization and distribution in GABAergic and glutamatergic neurons in the rat brain. *J Neurochem* 62: 445-455.
- Erecinska M (1987): The neurotransmitter amino acid transport systems. A fresh outlook to an old problem. *Biochem Pharmacol* 36: 3547-3555.
- Freneau Jr RT, Caron MG, Blakely RD (1992): Molecular cloning and expression of a high affinity L-proline transporter expressed in putative glutamatergic pathways of rat brain. *Neuron* 8: 915-926.
- Fricke U (1975): Tritosol: a new scintillation cocktail based on Triton X-100. *Anal Biochem* 63: 555-558.
- Fueshko SM, Schengrund C-L (1990): Murine neuroblastoma cells express ganglioside binding sites on their cellular surface. *J Neurochem* 54: 1791-1797.
- Gatt S, Rapport MM (1966): Isolation of  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucosidase from brain. *Biochim Biophys Acta* 113: 567-576.
- Gomez J, Casado M, Giménez C, Aragón C (1991): Inhibition of high-affinity  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake in primary astrocyte cultures by phorbol esters and phospholipase C. *Biochem J* 275: 435-439.
- Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Kenyan S, Miedel MC, Davidson N, Lester H, Kanner B (1990): Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303-1306.
- Guimbal C, Kilimann MW (1993): A Na<sup>+</sup>-dependent creatine transporter in rabbit brain, muscle, heart and kidney cDNA cloning and functional expression. *J Biol Chem* 268: 8418-8421.
- Guimbal C, Kilimann MW (1994): A creatine transporter cDNA from Torpedo illustrates structure/function relationships in the GABA/noradrenaline transporter family. *J Mol Biol* 241: 317-324.
- Hansson E, Rönnbäck L (1991): Receptor regulation of the glutamate, GABA and taurine high-affinity uptake into astrocytes in primary culture. *Brain Res* 548: 215-221.
- Hechtler V, Mersel M, Dreyfus H, Maitre M (1990): Effects of phospholipases, proteases and neuraminidase on g-hydroxybutyrate binding sites. *Mol Cell Biochem* 93: 87-94.
- Hollmann M, Seifert W (1986): Gangliosides modulate glutamate receptor binding in rat brain synaptic plasma membranes. *Neurosci Lett* 65: 133-138.
- Hollmann M, Harnecker J, Seifert W (1988): Calcium ions induce glutamate transport into rat brain membrane vesicles in the absence of sodium and chloride: evidence for a novel uptake site? *FEBS Lett* 228: 74-78.
- Hollmann M, Seifert W (1989): Glutamate transport and not glutamate receptor binding is stimulated by gangliosides in a Ca<sup>2+</sup>-dependent manner in rat brain synaptic plasma membranes. *J Neurochem* 53: 716-723.
- Infante S, Zárate G (1984): Métodos estadísticos: un enfoque interdisciplinario. Trillas, México.

- Iversen LL (1971) Role of transmitter uptake mechanisms in synaptic neurotransmission. *Br J Pharmacol* 41: 571-591.
- Jessell TM, Kandel ER (1993): Synaptic transmission: a bidirectional and self modifiable form of cell-cell communication. *Cell* 72/*Neuron* 10 (Suppl): 1-30.
- Jursky F, Tamura S, Tamura A, Mandiyan S, Nelson H, Nelson M (1994): Structure, function and brain localization of neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* 196: 283-295.
- Kanai Y, Smith CP, Hediger MA (1993): The elusive transporters with a high affinity for glutamate. *Trends Neurosci* 16: 365-370.
- Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM (1991): Principles of neural science. Third edition. New York: Elsevier.
- Kanner BI (1978): Active transport of  $\gamma$ -aminobutyric acid by membrane vesicles isolated from brain. *Biochemistry* 17: 1207-1211.
- Kanner BI, Sharon I (1978): Active transport of of L-glutamate by membrane vesicles isolated from rat brain *Biochemistry* 17: 3949-3953.
- Kanner BI, Bendahan A (1982): Binding order of substrates to the sodium and potassium ion-coupled L-glutamate transporter from rat brain. *Biochemistry* 21: 6327-6330.
- Kanner BI (1983): Bioenergetics of neurotransmitter transport. *Biochim Biophys Acta* 726: 293-316.
- Kanner BI, Bendahan, Radian R (1983): Efflux and exchange of  $\gamma$ -aminobutyric acid and nipecotic acid catalysed by synaptic plasma membrane vesicles isolated from immature rat brain. *Biochim Biophys Acta* 731: 54-62.
- Kanner BI (1994): Sodium-coupled neurotransmitter transport: structure, function and regulation. *J Exp Biol* 196: 237-249.
- Keshet GI, Bendahan A, Su H, Mager S, Lester HA, Kanner BI (1995): Glutamate-101 is critical for the function of the sodium and chloride-coupled GABA transporter GAT-1. *FEBS Lett* 371: 39-42.
- Keynan S, Kanner BI (1988): Gamma-aminobutyric transport in reconstituted preparations from rat brain: coupled sodium and chloride fluxes. *Biochemistry* 27: 12-17.
- Kilty JE, Lorang D, Amara SG (1991): Cloning and expression of a cocaine sensitive rat dopamine transporter. *Science* 254: 578-579
- Kim JYH, Goldenring JR, De Lorenzo RJ, Yu RK (1986): Gangliosides inhibit phospholipid-sensitive  $Ca^{2+}$ -dependent phosphorylation of rat myelin basic proteins. *J Neurosci Res* 15: 159-166.
- King SC, Fleming SR, Brechtel CE (1995): Ligand recognition properties of the *Escherichia coli* 4-aminobutyrate transporter encoded by gabP. Specificity of Gab permease for heterocyclic inhibitors.

- Kitayama S, Shimada S, Xu H, Markham L, Donovan DM, Uhl GR (1992): Dopamine transporter site-directed mutations differentially alter substrate transport and cocaine binding. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 7782-7785.
- Kleinberger-Doron N, Kanner BI (1994): Identification of tryptophan residues critical for the function and targeting of the  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter (subtype A). *J Biol Chem* 269: 3063-3067.
- Krishnaraj R, Saat YA, Kemp RG (1980): Binding of monosialoganglioside by murine thymus cells in vitro. *Cancer Res* 40: 2808-2813.
- Ledeer R (1985): Gangliosides of the neuron. *Trends Neurosci* 8: 169-174.
- Ledeer R (1989): Biosynthesis, metabolism, and biological effects of gangliosides. In Margolis RU, Margolis RK (eds): "Neurobiology of glycoconjugates". New York: Plenum Press, pp 43-83.
- Lew R, Vaughn R, Simantov R, Wilson A, Kuhar MJ (1991): Dopamine transporters in the nucleus accumbens and the striatum have different apparent molecular weights. *Synapse* 8: 152-153.
- Lew R, Patel A, Vaughn RA, Wilson A, Kuhar MJ (1992): Microheterogeneity of dopamine transporters in rat striatum and nucleus accumbens. *Brain Res* 584: 266-271.
- Liu QR, López-Corcuera B, Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1992a): Cloning and expression of a cDNA encoding the transporter of taurine and  $\beta$ -alanine in mouse brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 12145-12149.
- Liu QR, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1992b): A family of genes encoding neurotransmitter transporters. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 6639-6643.
- Liu QR, Nelson H, Mandiyan S, López-Corcuera B, Nelson N (1992c): Cloning and expression of a glycine transporter from mouse brain. *FEBS Lett* 305: 110-114.
- Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1993a): Cloning and expression of a spinal chord and brain-specific glycine transporter with novel structural features. *J Biol Chem* 268: 22802-22808.
- Liu QR, López-Corcuera B, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1993b): Molecular characterization of four pharmacologically distinct  $\gamma$ -aminobutyric acid transporters in mouse brain. *J Biol Chem* 268: 2104-2112.
- Liu QR, Mandiyan S, López-Corcuera B, Nelson H, Nelson N (1993c): A rat brain cDNA encoding the neurotransmitter with an unusual structure. *FEBS Lett* 315: 114-118.
- Logan WJ, Snyder SH (1971): Unique high affinity uptake systems for glycine, glutamate and aspartic acids in central nervous tissue of the rat. *Nature* 234: 297-299.
- López-Corcuera B, Kanner BI, Aragón C (1989): Reconstitution and partial purification of the sodium- and chloride-coupled glycine transporter from rat spinal cord. *Biochim Biophys Acta* 983: 247-252.

- López-Corcuera B, Liu QR, Mandiyan S, Nelson H, Nelson N (1992): Expression of a mouse brain cDNA encoding novel  $\gamma$ -amino-butyric acid transporter. *J Biol Chem* 267: 17491-17493.
- Löscher W, Bohme G, Muller F, Pagliusi S (1985): Improved method for isolating synaptosomes from 11 regions of one rat brain: electron microscopic and biochemical characterization and use in the study of drug effects on nerve terminal  $\gamma$ -aminobutyric acid in vivo. *J Neurochem* 45: 879-889.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Mahjeesh NI, Kanner BI (1993): Neither amino nor carboxyl termini are required for function of the sodium- and chloride -coupled gamma-aminobutyric acid transporter from rat brain. *J Biol Chem* 267: 2563-2568.
- Mager S, Naeve J, Quick M, Labarea C, Davidson N, Lester HA (1993): Steady states, charge movements, and rates for a cloned GABA transporter expressed in *Xenopus* oocytes. *Neuron* 10: 177-188.
- Maggio B, Cumar FA, Caputto R (1978): *Biochem J* 175: 1113-1118.
- Maggio B, Cumar FA, Caputto R (1981): *Biochim Biophys Acta* 650: 69-87.
- Martin DL (1976): Carrier-mediated transport and removal of GABA from synaptic regions. In Roberts E, Chase TN, Tower DB (eds): "GABA in Nervous System Function". New York: Raven Press, pp 347-386.
- Masserini M, Palestini P, Venerando B, Fiorilli A, Acquati D, Tettamanti G (1988): Interactions of proteins with ganglioside-enriched microdomains on the membrane; the lateral phase separation of molecular species of GD1a ganglioside having homogeneous long chain base composition is recognized by *Vibrio cholerae* sialidase. *Biochemistry* 27: 7973-7978.
- Mayser W, Schloss P, Betz H (1992): Primary structure and functional expression of a choline transporter expressed in the rat nervous system. *FEBS Lett* 305: 31-36.
- Maysinger D, Leavitt BR, Zore B, Butula I, Fernandes LG, Rebeiro-da-Silva, A (1992): Inhibition of high-affinity choline uptake in the rat brain by neurotoxins: effects of monosialoganglioside GM1. *Neurochem Int* 20: 289-297.
- McCrea JF (1947): *Aust J Exp Biol Med Sci* 25: 127; citado en Wenger y Wardell (1973).
- Nagai Y (1995): Functional roles of gangliosides in bio-signaling. *Behav Brain Res* 66: 99-104.
- Nagata Y, Ando M, Iwata M, Hara A, Taketomi T (1987): Effect of exogenous gangliosides on amino acid uptake and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in superior cervical and nodose ganglia of rats. *J Neurochem* 49: 201-207.
- Nelson H, Mandiyan S, Nelson N (1990): Cloning of the human brain GABA transporter. *FEBS Lett* 269: 181-184.
- Nelson N, Lill H (1994): Porters and neurotransmitter transporters. *J Exp Biol* 196: 213-228.

- Norden AGW, Tennant LL, O'Brien JS (1974): GM1 ganglioside  $\beta$ -galactosidase A. *J Biol Chem* 249: 7969-7976.
- Ohman R, Rosenberg A, Svennerholm L (1970): Human brain sialidase. *Biochemistry* 9: 3774-3782.
- Ollmann M, Schwarzmann G, Sandhoff K, Galla H-J (1987): Pyrene-labeled gangliosides: micelle formation in aqueous solution, lateral diffusion and thermotropic behavior in phosphatidylcholine bilayers. *Biochemistry* 26: 5943-5952.
- Osawa I, Saito N, Koga T, Tanaka C (1994): Phorbol ester-induced inhibition of GABA uptake by synaptosomes and by *Xenopus* oocytes expressing GABA transporter (GAT1). *Neurosci Res* 19: 287-293.
- Pacholczyk T, Blakely RD, Amara SG (1991): Expression cloning of a cocaine- and antidepressant-sensitive human noradrenaline transporter. *Nature* 350: 350-354.
- Pantano S, Bendahan A, Kanner BI (1993): Only one of the charged amino acids located in the transmembrane  $\alpha$ -helices of the  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter (subtype A) is essential for its activity. *J Biol Chem* 268: 3222-3225.
- Peters MW, Mellhorn IE, Barber KR, Grant CWM (1984): Evidence of a distribution difference between two gangliosides in bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta* 778: 419-428.
- Probst W, Möbius D, Rammann H (1984): Modulatory effects of different temperatures and  $Ca^{2+}$  concentrations on gangliosides and phospholipids in monolayers at air/water interfaces and their possible functional role. *Cell Mol Neurobiol* 4: 157-176.
- Rammann H, Rösner H, Breer H (1976): A functional model of sialoglyco-macromolecules in synaptic transmission and memory formation. *J Theor Biol* 57: 231-237.
- Rammann H (1983): Functional implication of gangliosides in synaptic transmission. *Neurochem Int* 5: 539-547.
- Rammann H, Rösner H, Körte K-H, Beiting H, Seybold V (1994):  $Ca^{2+}$ -ganglioside-interaction in neuronal differentiation and development. *Prog Brain Res* 101: 127-145.
- Rammann H (1995): Brain gangliosides and memory formation. *Behav Brain Res* 66: 105-116.
- Rösner H, Al-Aqtum M, Sonntag U, Wurster A, Rammann H (1992): Cell surface distribution of endogenous and effects of exogenous gangliosides on neuronal survival, cell shape and growth in vitro. *Neurochem Int* 20: 409-419.
- Saqr HE, Pearl DK, Yates AJ (1993): A review and predictive models of ganglioside uptake by biological membranes. *J Neurochem* 61: 395-411.
- Schauer R, Veh RW, Sander M, Corfield AP, Wiegandt H (1980): "Neuraminidase-resistant" sialic acid residues of gangliosides. *Adv Exp Med Biol* 125: 283-294.
- Schengrund CL, Rosenberg A (1970): Intracellular location and properties of brain sialidase. *J Biol Chem* 245: 6196-6200.



- Schifferer F, Beitzinger H, Rahmann H (1989): Comparative molecular investigation with acidic glycosphingolipids from vertebrates and invertebrates as model for their functional roles in biomembranes. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 370: 630.
- Schloss P, Püschel AW, Betz H (1994): Neurotransmitter transporters: new members of known families. *Curr Opin Cell Biol* 6: 595-599.
- Shimada S, Kitayama S, Lin C-L, Patel A, Nanthakumar E, Gregor P, Kuhar M, Uhl G (1991): Cloning and expression of a cocaine-sensitive dopamine transporter complementary DNA. *Science* 254: 576-578.
- Shouffani A, Kanner BI (1990): Cholesterol is required for the reconstitution of the sodium- and chloride-coupled g-aminobutyric transporter from rat brain. *J Biol Chem* 265: 6002-6008.
- Smith KE, Borden LA, Wang C-H, Hartig PR, Branchek T, Weinshank RL (1992): Cloning and expression of a high-affinity taurine transporter from rat brain. *Mol Pharmacol* 45: 573-569.
- Sonnino S, Chigorno V, Acquotti D, Pitto M, Kirschner G, Tettamanti G (1992): Specific ganglioside-cell protein interactions: a study performed with GM1 ganglioside derivative containing photoactivable azide and rat cerebral granular cells in culture. *Neurochem Int* 20: 315-321.
- Stevens BR, Fernández A, Hirayama B, Wright EM, Kempner ES (1990): Intestinal brush border membrane Na<sup>+</sup> glucose cotransporter functions *in situ* as a homotetramer. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1456-1460.
- Svennerholm L (1963): Isolation of gangliosides. *Acta Chem Scand* 17: 239-250.
- Svennerholm L (1980): Ganglioside designation. *Adv Exp Med Biol* 125: 11.
- Sussman JL, Silman I (1992): Acetylcholinesterase: structure and use as a model for specific cation-protein interactions. *Curr Opin Struct Biol* 2: 721-729.
- Suzuki K, Tanaka H, Yamanaka T, Van Damme O (1980): The specificity of  $\beta$ -galactosidase in the degradation of gangliosides. *Adv Exp Med Biol* 125: 307-318.
- Swanson GT, Umbach JA, Gundersen CB (1994): Glia of the cholinergic electromotor nucleus of *Torpedo* are the source of the cDNA encoding a GAT-1-like GABA transporter. *J Neurochem* 63: 1-12.
- Tallman JF, Brady RO (1972): The catabolism of Tay-Sachs ganglioside in rat brain lysosomes. *J Biol Chem* 247: 7570-7575.
- Tapia R (1983):  $\gamma$ -aminobutyric acid. Metabolism and biochemistry of synaptic transmission. In Lajtha A (ed): "Handbook of Neurochemistry". New York: Plenum Press, Vol 3, pp 423-466.
- Tapia R, Salazar C (1989): Chelation of endogenous membrane calcium inhibits  $\gamma$ -aminobutyric acid uptake in synaptosomes. *J Neurosci Res* 24: 293-298.
- Taylor J, Gordon-Weeks PR (1991): Calcium-independent  $\gamma$ -aminobutyric acid release from growth cones: role of  $\gamma$ -aminobutyric acid transport. *J Neurochem* 56: 273-280.

- Tettamanti G, Preti A, Cestaro B, Venerando B, Lombardo A, Ghidoni R, Sonnino S (1980): Gangliosides, neuraminidase and sialyltransferase at the nerve endings. *Adv Exp Med Biol* 125: 263-281.
- Tettamanti G (1984): An outline of ganglioside metabolism. *Adv Exp Med Biol* 174: 197-211.
- Tettamanti G, Riboni L (1994): Gangliosides turnover and neural cells function: a new perspective. *Prog Brain Res* 101: 73-100.
- Thomas PD, Brewer GJ (1990): Gangliosides and synaptic transmission. *Biochim Biophys Acta* 1031: 277-289.
- Toffano G, Benvenuto D, Bonnetti AC, Facci L, Leon A, Orlando P, Ghidoni R, Tettamanti G (1980): Interactions of GM1 ganglioside with crude rat brain neuronal membranes. *J Neurochem* 35: 861-866.
- Uchida S, Kwon HN, Yamauchi A, Preston AS, Marumo F, Handler JS (1992): Molecular cloning of the cDNA for an MCDK cell Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent taurine transporter that is regulated by hypertonicity. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8230-8234.
- Uhl GR, Kitayama S, Gregor P, Nanthakumar E, Persico A, Shimada S (1992): Neurotransmitter transporter family cDNAs, in a rat mid-brain library: 'Orphan transporters' suggest sizable structural variations. *Mol Brain Res* 16: 353-359.
- Usdin TB, Mezey E, Chen C, Brownstein MJ, Hoffman BJ (1991): Cloning of the cocaine-sensitive dopamine transporter. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 11168-11171.
- Vandenberg DJ, Persico AM, Uhl GR (1992): A human dopamine transporter cDNA predicts reduced glycosylation, displays a novel repetitive element and provides racially-dimorphic Taq I RFLPs. *Mol Brain Res* 15: 161-166.
- Warren L (1959): The thiobarbituric acid assay for sialic acids. *J Biol Chem* 234: 1971-1975.
- Wenger DA, Wardell S (1973): Action of neuraminidase (EC 3.2.1.18) from *Clostridium perfringens* on brain gangliosides in the presence of bile salts. *J Neurochem* 20: 607-612.
- Wheeler DD (1980): Sodium dependence of GABA transport in rat hypothalamic synaptosomes. *J Neurosci Res* 5: 323-337.
- Wiegandt H (1994): Principles of glycosphingolipid-oligosaccharide constitution. *Prog Brain Res* 101: 63-73.
- Wiegandt H (1995): The chemical constitution of gangliosides of the vertebrate nervous system. *Behav Brain Res* 66: 85-97.
- Wieraszko A, Seifert W (1985): The role of monosialoganglioside GM1 in synaptic plasticity: in vitro study on rat hippocampal slices. *Brain Res* 345: 159-164.
- Wieraszko A, Seifert W (1986): Evidence for the functional role of monosialoganglioside GM1 in synaptic transmission in the rat hippocampus. *Brain Res* 371: 305-313.
- Wright EM, Hager KM, Turk E (1992): Sodium cotransport proteins. *Curr Opin Cell Biol* 4: 696-702.

Wu G, Ledeen RW (1991): Stimulation of neurite outgrowth in neuroblastoma cells by neuraminidase: putative role of GM1 ganglioside in differentiation. *J Neurochem* 56: 95-104.

Yamauchi A, Uchida S, Kwon HM, Preston AS, Robey RB, García-Pérez A, Burg MB, Handler JS (1992): Cloning of a Na<sup>+</sup>- and Cl<sup>-</sup>-dependent betaine transporter that is regulated by hypertonicity. *J Biol Chem* 267: 649-652.

Yohe H, Rosenberg A (1972): Interaction of triiodide anion with gangliosides in aqueous iodine. *Chem Phys Lipids* 9: 279-284.

Yu RK, Saito M (1989): Structure and localization of gangliosides. In Margolis RU, Margolis RK (eds): "Neurobiology of Glycoconjugates". New York: Plenum Press, pp1-42.

Zaleska MM, Erecinska M (1987): Role of sialic acid in synaptosomal transport of aminoacid transmitters. *Proc Natl Acad Sci USA* 84: 1709-1712.